

وزارت جهاد كشاورزی  
سازمان تحقیقات و آموزش كشاورزی  
مؤسسه تحقیقات شیلات ایران - انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری دکتر دادمان

انجماد اسپرم ماهیان خاویاری  
شیپ، فیل ماهی، ازون برون  
و تاسماهی ایرانی در فصل تکثیر

مجری :

علیرضا علیپور

شماره ثبت

۱۵/۷۳۴

وزارت جهاد کشاورزی  
سازمان تحقیقات و آموزش کشاورزی  
مؤسسه تحقیقات شیلات ایران - انستیتو تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری

عنوان پروژه / طرح : انجماد اسپرم ماهیان خاویاری شیپ، فیل ماهی، ازون برون و تاسماهی ایرانی در فصل تکثیر  
شماره مصوب : ۷۹-۰۷۱۰۱۴۱۰۰۰-۰۱

نام و نام خانوادگی نگارنده / نگارنده گان : علیرضا علیپور  
نام و نام خانوادگی مجری مسئول ( اختصاص به پروژه ها و طرحهای ملی و مشترک دارد ) : -

نام و نام خانوادگی مجری / مجریان : علیرضا علیپور  
نام و نام خانوادگی همکاران : محمدرضا نوروز فشخامی - شهروز برادران نویری  
نام و نام خانوادگی مشاور (ان) : محمد پورکاظمی

محل اجرا : استان گیلان

تاریخ شروع : ۱۳۷۹

مدت اجرا : ۳ سال و ۶ ماه

ناشر : مؤسسه تحقیقات شیلات ایران

شمارگان ( تیتراژ ) : ۱۵ نسخه

تاریخ انتشار : سال ۱۳۸۶

حق چاپ برای مؤلف محفوظ است . نقل مطالب ، تصاویر ، جداول ، منحنی ها و نمودارها با ذکر مأخذ بلامانع است .

عنوان	«فهرست مندرجات»	صفحه
چکیده	-----	۱
۱ - مقدمه	-----	۳
۲ - مواد و روش کار	-----	۱۴
۳ - نتایج	-----	۲۵
۴ - بحث	-----	۳۵
پیشنهادها	-----	۴۱
منابع	-----	۴۳
چکیده انگلیسی	-----	۴۵

**MINISTRY OF JIHAD - E - AGRICULTURE**  
**AGRICULTURE RESEARCH AND EDUCATION ORGANIZATION**  
**IRANIAN FISHERIES RESEARCH ORGANIZATION- INTERNATIONAL STURGEON**  
**RESEARCH INSTITUTE**

**Cryopreservation of sperm in *Acipenser*  
*nudiventris*, *Huso huso*, *Acipenser stellatus*  
and *Acipenser persicus* in the breeding  
season**

**Executor :**  
***Alireza Alipoor***



**Ministry of Jihad – e – Agriculture**  
**Agriculture Research and Education Organization**  
**IRANIAN FISHERIES RESEARCH ORGANIZATION – INTERNATIONAL STURGEON**  
**RESEARCH INSTITUTE**

---

**Title:** Cryopreservation of sperm in *Acipenser nudiventris*, *Huso huso*, *Acipenser stellatus* and *Acipenser persicus* in the breeding season

**Approved Number :**79-0710141000-01

**Author:** *Alireza Alipoor*

**Executor :** *Alireza Alipoor*

**Collaborator :** M.R. Norooz Fashkhami; Sh. Baradaran Novairi

**Advisor :** M.R. Pourkazemi

**Location of execution :** Guilan

**Date of Beginning :** 2000

**Period of execution :** 3 years & 6 months

**Publisher :** *Iranian Fisheries Research Organization*

**Circulation :** 15

**Date of publishing :** 2007



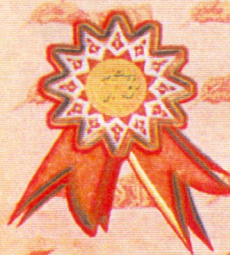


بائسره قلا



طرح انجماد اسپرم ماهیان خاویاری، شیپ، فیل ماهی، ازون برون و تاس  
ماهی ایران در فصل تکثیر با مسئولیت اجرایی آقای علیرضا علیپور<sup>۱</sup> در تاریخ  
۱۳۸۴/۹/۲۸ در کمیته تخصصی شیلات با رتبه عالی تأیید شد.

موسسه تحقیقات شیلات ایران



۱- آقای علیرضا علیپور متولد سال ۱۳۴۶ در شهرستان رشت دارای مدرک تحصیلی فوق لیسانس در رشته شیلات بوده  
و در حال حاضر به عنوان رئیس بخش اطلاعات علمی در انستیتو تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری مشغول به  
فعالیت می باشند.



## چکیده

با توجه به روند کاهش صید ماهیان خاویاری و خطر نابودی ذخایر این ماهیان، بکارگیری تدابیر و اقدامات اساسی در این خصوص الزامی است. یکی از روشهای جلوگیری از انقراض نسل آنها، ذخیره سازی و ایجاد بانک گامت منجمد با استفاد از تکنیک انجماد اسپرم است.

در این تحقیق، ۲۷ عدد مولد نر از چهار گونه ماهیان خاویاری شامل: ۱۲ مولد نر تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus*)، ۷ مولد ازون برون (*Acipenser stellatus*)، ۵ مولد شیپ (*Acipenser nudi ventries*) و ۳ مولد فیل ماهی (*Huso huso*) طی سالهای ۸۳ - ۱۳۸۰ مورد استفاد قرار گرفت. استحصال اسپرم از مولدین در مراکز تکثیر و پرورش مصنوعی ماهیان خاویاری شهید بهشتی رشت و شهید مرجانی گرگان انجام گردید و اسپرم استحصالی از مرکز تکثیر شهید مرجانی در ظروف دربسته و در درجه حرارت نزدیک صفر درجه توسط کلمن یخ به آزمایشگاه انجماد اسپرم انستیتو تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری منتقل شده و مورد بررسی و مطالعه قرار گرفت.

در این پژوهش اسپرم ماهیان خاویاری در دو محیط کشت حاوی ماده محافظ سرمایی دی متیل سولفو کساید (CM) و ماده محافظ گلیسرول (BC) به نسبت ۱:۱ رقیق شده و از دو نوع محفظه، سرنگ انسولین با حجم یک میلی لیتر و پایوت با حجم نیم میلی لیتر، جهت ذخیره استفاده گردید. اسپرم رقیق شده توسط دستگاه فریزر خودکار مدل ۵۳۰۰ (شرکت IMV فرانسه) قابل برنامه ریزی با شدت سرمایی مخصوص مورد انجماد قرار گرفت. برای انجماد محفظه ها، از روش انجماد سه مرحله ای به شرح ذیل استفاده گردید.

۱- شروع انجماد از ۵+ به ۱۰- درجه سانتیگراد با سرعت ۳ درجه سانتیگراد در دقیقه

۲- از ۱۰- تا ۷۰- درجه سانتیگراد با سرعت ۲۰ درجه سانتیگراد در دقیقه

۳- از ۷۰- تا ۱۳۰- درجه سانتیگراد با سرعت ۲۵ درجه سانتیگراد در دقیقه

محفظه ها پس از طی فرآیند انجماد، در کانتینرهای ازت مایع با برودت ۱۹۶- ذخیره و نگهداری گردید.

برای انجمادزدایی، لوله های محتوی اسپرم از نیتروژن مایع خارج و به مدت ۲۵ ثانیه در آب ۴۰ درجه قرار داده شد سپس درصد و کیفیت تحرک اسپرم در زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی (۴۰۰×) مورد ارزیابی قرار گرفت.

براساس نتایج بدست آمده میانگین درصد تحرک اسپرم تازه در گونه تاسماهی ایرانی، ازون برون، شپ و فیل ماهی به ترتیب ۷۵، ۸۷، ۵/۶۷ و ۶۶/۷۶ درصد بود و میانگین درصد تحرک اسپرم منجمد شده با محیط کشت (CM) به ترتیب ۳۲، ۳۷/۵، ۴۰ و ۲۰ درصد و با محیط کشت (Biociphus) به ترتیب ۵/۲، ۷۵/۲۵، ۴/۱۱ و ۲/۶۶ بوده است.

میانگین درصد لقاح تخم در گونه های مذکور به ترتیب ۹۰، ۷۲، ۷۱/۲۵ و ۹۰ درصد در گروه شاهد محاسبه گردید و میانگین درصد لقاح تخم با اسپرم منجمد، با محیط کشت (CM) به ترتیب ۳۰، ۶/۵، ۳۹/۲۵ و ۴/۷۵ درصد و درصد لقاح اسپرم منجمد با محیط کشت (Biociphus) صفر درصد برآورد شد. در بررسی نتایج درصد لقاح در دو نوع محفظه نگهداری اسپرم شامل سرنگ انسولین و پایوت هیچ گونه اختلاف معنی دار آماری مشاهده نشد.

براساس بررسیهای بعمل آمده محیط کشت (CM) با ماده محافظ سرمایی دی میتل سولفو کساید، رقیق کننده مناسبی برای انجماد اسپرم ماهیان خاویاری بوده و تکنیک انجماد اسپرم می تواند یکی از روشهای حفاظت از اسپرم و جلوگیری از انقراض تاسماهیان محسوب گردد.

**لغات کلیدی:** ماهیان خاویاری، تاسماهی ایرانی، اسپرماتوزوئید، انجماد

## ۱- مقدمه

تولید مثل در اغلب ماهیان بصورت دوجنسی است که طی آن اسپرم زایی در نرها و تخمک گذاری در ماهیان ماده صورت می گیرد. از لقاح گامت هاپلوئید نر و تخمک، سلول دیپلوئید زیگوت حاصل می شود و در سایه همین پدیده لقاح، بقاء نسل با حفظ ویژگی های فردی و نژادی در هر گونه امکان پذیر گردیده است. پدیده تولد، مهمترین رخداد هر جانور است (قاضی و همکاران، ۱۳۷۲).

در شرایط عادی طول عمر گامت های نر خیلی کم است و نمی توان آنها را به سهولت با حفظ خصوصیات لقاح دهی آن نگهداری کرد ولی حیات اسپرماتوزوئیدها در حرارت پایین زیاده تر می شود.

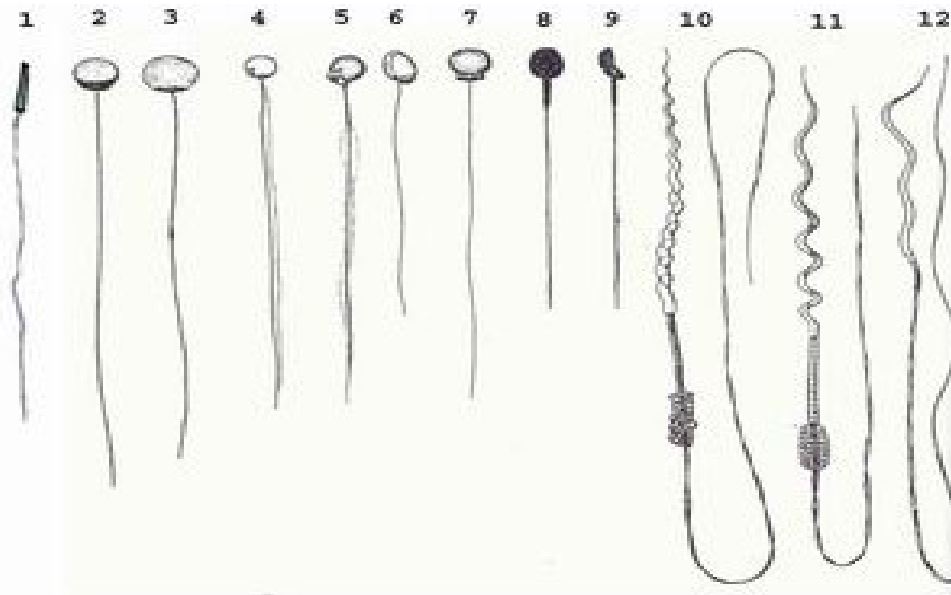
در رابطه با حفظ و نگهداری اسپرم ها، مواد و روش های مختلفی توسط محققین پیشنهاد شده است که هر یک در مورد گونه ای خاص مطالعه نموده و درصد موفقیت هریک متفاوت بوده است.

نگهداری اسپرم در شرایط انجماد (Cryopreservation) شاخه ای از علم Cryobiology است که در آن به حفظ و نگهداری مواد بیولوژیک در دماهای پائین پرداخته می شود (نویری، ۱۳۷۷).

اگر چه شرایط خاص سلول و حساسیت بیش از حد آن نسبت به شوک های حرارتی و برودتی موجب می شود موفقیت در انجماد همواره پایین باشد.

### ۱-۱- شکل و ساختمان اسپرم

اسپرماتوزوئید، سلول n کرموزومی است که در نتیجه مراحل مختلف اسپرماتوزنز بوجود می آید و دارای سه بخش سر، تنه و دم می باشد. سر گامت نر در ماهیان مختلف، متفاوت است و به اشکال کروی، بیضی و میله ای وجود دارند. سر اسپرم در ماهی سفید، کپور و آمور کروی است. در ماهیان خاویاری بشکل میله ای و چوب کبریتی است و قسمت زیادی از سر، توسط هسته اشغال شده و کروماتین بشدت فشرده است. رأس اسپرم در تاسماهیان، کلاهکی به نام آکروزوم وجود دارد که نقش مهمی در لقاح با تخمک دارد. تنه اسپرم حاوی میتوکندری است که از نظر تولید انرژی حرکتی سلول از اهمیت زیادی برخوردار است. دم در زمان اسپرماتوزنز منشاء گرفته و بصورت تاژک بلندی، از ناحیه گردن و در زیر قسمت تنه واقع شده است که شامل فیبریل های پروتئینی است و به حرکت اسپرم کمک می کند.



1- sturgeon 2- Bowfish 3- Carp 4- Pike 5- Perch 6- *Gobius niger* 7- ماهیان 8- *Viviparous blenny* 9- *Cottus bairdii* 10- *Squalus acanthias* 11- *Raja clavata* 12- *Chimaera monstrosa*

## ۱-۲- روش اسپرم گیری

اسپرم گیری از مولدین تاسماهیان، پس از پایین آوردن سطح آب استخر کورانسکی در داخل آن صورت می گیرد. بعد از انتخاب ماهی نر رسیده با پتک چوبی چند ضربه به سر ماهی وارده شده تا بیهوش گردد، روش صحیح گرفتن گامت نر از مولدین، استفاده از مواد بیهوش کننده است که این امر به جهت کاهش اثر استرس ناشی از وارد شدن ضربه به سر ماهی بر کیفیت اسپرم، توصیه می شود. مطابق معمول، برای اسپرم گیری از مولدین کوچک، سر و دم ماهی با دو دست گرفته شده، بطوری که سر ماهی بطرف بالا و دم بطرف پایین قرار گیرد. ابتدا محوطه مجرای تناسلی و شکمی، با پارچه حوله ای کاملاً خشک شده و با فشار در ناحیه پشت ماهی، اسپرم از منفذ تناسلی با فشار در ظرف آلومینیومی جمع آوری می گردد. برای استحصال اسپرم از مولدین نر بزرگتر از سرنگ ۵۰ میلی لیتری متصل به تیوپ پلاستیکی (Tygon) استفاده می شود.

## ۱-۳- ارزیابی کیفی اسپرم

ساده ترین و قابل قبول ترین روش برای پی بردن به کیفیت مناسب اسپرم، قدرت تحرک آن است (Turner, 1986). معمولاً اسپرم هایی که در زمان اوج تخم ریزی استحصال می گردد دارای کیفیت بهتری می باشد (Stoss, 1983).

کیفیت اسپرم از روی چگونگی حرکت اسپرماتوزوئیدها تعیین می گردد. اسپرماتوزوئیدها دارای سه نوع حرکت هستند: حرکت مستقیم و موج، حرکت پاندولی و حرکت مارپیچی. «پرسوف» پنج حالت جهت تعیین حرکت اسپرماتوزوئیدها به شرح ذیل پیشنهاد نموده است. (Dettlaff, 1993)

- ۱- حرکت سریع و رو به جلو در همه اسپرمها مشاهده می شود
- ۲- حرکت سریع و رو به جلو در بیشتر اسپرم ها و مشاهده اسپرماتوزوئیدها با حرکت آهسته و زیگزاک که در میدان دید میکروسکوپ قابل دیدن است.
- ۳- حرکت سریع و رو به جلو در بعضی از سلولها جنسی و نمونه های اسپرم بدون تحرک دیده می شود.
- ۴- حرکت رو به جلو در اسپرم ها کم است، تقریباً ۷۵ درصد سلولها بدون حرکت هستند.
- ۵- همه اسپرماتوزوئیدها بدون حرکت هستند.

نمونه هایی که توده زیادی از اسپرمها دارای حرکت سریع و نامشخص باشند، نمونه با کیفیت خوب، نمونه هایی که توده زیادی از اسپرمها دارای حرکت سریع باشند ولی حرکت تک تک اسپرمها قابل مشاهده باشد، نمونه با کیفیت متوسط و نمونه اسپرمهایی که حدود ۵۰ درصد از اسپرمها دارای حرکت کند و مشخص باشد، نمونه با کیفیت ضعیف در نظر گرفته شده است.

در فرآیند انجماد باید به این مسئله مهم توجه داشت که همواره نمونه اسپرمهایی انتخاب شود که دارای درصد و کیفیت تحرک زیادی باشند. همچنین از زمان استحصال آن مدت زمان زیادی طی نشده باشد. زیرا طی مراحل انجماد بدلیل وارد شدن شوک های اسمزی و فیزیکی ناشی از کریستاله شدن به سلولها تعداد زیادی از آنها از بین می روند و در صورت استفاد از اسپرم نامناسب درصد تحرک بعد از انجمادزدایی فوق العاده کم خواهد شد.

#### ۴-۱- ارزیابی کمی اسپرم

تولید اسپرم در ماهیان بسیار زیاد است و تراکم گامت جنسی نر در گونه های مختلف ماهیان، متفاوت گزارش شده است. بطور کلی، میانگین غلظت اسپرم تاسماهیان در هر سانتیمتر مکعب بیش از یک میلیارد سلول است. جهت تعیین تراکم اسپرماتوزوئید (تعداد اسپرم در یک حجم مشخص مثلاً ۱ میلی لیتر) از لام هموسیئومتر استفاده می شود (هاشمی، ۱۳۷۵). هموسیئومتر یا لام توما متشکل از یک لام شیشه ای است که در مرکز آن



دارای یک مربع بزرگ به اندازه یک میلیمتر مربع است. این مربع بزرگ با خطوط ظریف و متقاطعی به ۲۵ مربع کوچک تقسیم شده که ضلع هر کدام ۲۰۰ میکرون است. هر یک از این مربعات خود به ۱۶ مربع کوچکتر تقسیم شده که طول ضلع آنها ۵۰ میکرون است و در مجموع چهارصد مربع کوچکتر با اضلاع یک بیستم میلیمتر مربع ایجاد شده با احتساب یک دهم میلیمتر عمق خانه‌ها، ۱/۴۰۰۰ میلیمتر مکعب خواهد بود.

### ۵-۱- ظروف نگهداری و ذخیره اسپرم

برای ذخیره اسپرم و نگهداری طولانی مدت در کانتینر ازت، لازم است اسپرم رقیق شده در داخل ظروفی ریخته شود. این محفظه‌ها باید دارای خصوصیات ویژه از جمله تحمل انقباض شدید ناشی از برودت‌های پایین انجماد و انبساط حاصل از انجماد زدایی و ذوب در آب گرم باشند.

ظروف ذخیره اسپرم در آمپولهای شیشه‌ای تا سال ۱۹۷۰ مرسوم بود و پس از آن از پایوت‌های پلاستیکی برای ذخیره‌سازی اسپرم استفاده گردید. در حال حاضر، از پایوت‌های ۱/۵، ۱/۲، ۱، ۵/۵، ۲۵/۵، ۱/۵ میلی‌لیتری و سرنگ انسولین یک میلی‌لیتری جهت انجماد اسپرم استفاده می‌شود. پایوت (straw) لوله نی مانندی است که یک طرف آن بوسیله ماده سیمانی پر شده است و به محض تماس با آب یا رقیق کننده بسته می‌شود و سر دیگر آن، پس از پر شدن با اسپرم رقیق شده بوسیله مسدود کننده حرارتی بسته می‌گردد.

### ۶-۱- مواد محافظت کننده (Cryoprotectant) و نقش آن در انجماد

مواد محافظ دارای اثر ضد سرمایی می‌باشند و اصلی‌ترین علت استفاده از آنها، جلوگیری از تشکیل کریستال یخ داخل سلولی است. مواد محافظ را می‌توان به دو گروه عمده تقسیم نمود:

۱) مواد محافظ نفوذپذیر (penetrating agent)

۲) مواد محافظ نفوذ ناپذیر (non penetrating agent)

مواد محافظ نفوذپذیر (داخل سلولی) شامل متانول، دی‌متیل سولفو کساید، اتیلن گلیکول، ۱ و ۲ پروپاندیول و گلیسرول می‌باشند. متانول سریع‌ترین و گلیسرول کندترین نفوذ را به داخل سلول دارند. این مواد جرم مولکولی کمتر از ۱۰۰ کیلو دالتون دارند و می‌توانند به داخل سلول وارد شوند.

مواد محافظ نفوذ ناپذیر (خارج از سلولی) به علت بزرگی و بار الکتریکی که دارند در خارج از سلول باقی می‌مانند. اغلب این مواد ملکول‌های قندی بزرگ مانند ساکارز، رافینوز و گلوکز یا پروتئین و لیپو پروتئین‌هایی

مانند زرده تخم مرغ و سرم جنین گوساله (BSA) و غیره می‌باشند. این مواد به روش‌های مختلف سبب محافظت سلول در مراحل انجماد می‌شوند. ترکیبات مذکور وارد سلول نمی‌شوند اما به خروج آب از سلول پیش از انجماد کمک می‌کنند. همچنین پس از انجماد هنگام آب‌دهی، با رقیق کردن محیط مانع از تورم بیش از حد سلول می‌شوند.

نقش مواد محافظ در انجماد بسیار متفاوت و پیچیده است. با توجه به ویژگی‌های مختلف این مواد، نحوه محافظت آنها از سلول متفاوت است. در مجموع، می‌توان به موارد ذیل اشاره کرد:

(۱) با افزودن ماده محافظ سرمایی به محیط کشت، موجب کاهش نقطه انجماد می‌شود.

(۲) دارای اثر بافری اند و از تغییرات pH جلوگیری می‌کنند.

(۳) موجب بالانس فشار اسمزی محلول می‌شود.

## ۷-۱- رقیق کننده

رقیق کننده یا محیط کشت، محلولی است، حاوی مواد معدنی و آلی که با ترکیبات یونی پلاسمای منی مطابقت دارد (Stoss, 1983). موفقیت در انجماد و استفاده از تکنیک انجماد اسپرم برای تلقیح مصنوعی، تا حد زیادی وابسته به ابداع و توسعه تهیه رقیق کننده است.

چون اسپرم در برودت پایین نمی‌تواند مدت زمان زیادی زنده بماند، استفاده از محیط کشت برای تامین انرژی، محافظت اسپرم از مواد متابولیک و تغییرات درجه حرارت لازم است. رقیق کننده مناسب باید دارای خواص ایزوتونیک، ظرفیت بافری مناسب و نگه دارنده اسپرم در مقابل شوک سرمایی باشد.

ترکیب رقیق کننده‌ها در گونه‌های مختلف ماهیان متغیر است. اصولاً محیط کشت، حاوی درصدی از مواد محافظ نفوذپذیر و نفوذ ناپذیر، درصدی از ترکیبات نمکی و آنتی بیوتیک برای جلوگیری از رشد میکروبی است.

## ۸-۱- مروری بر مطالعات انجام شده

ماهیان خاویاری از گونه‌های مهم و با ارزش دریای خزر هستند که به دلیل شرایط نامساعد اکولوژیک و آثار سوء فعالیت‌های انسانی (Cherepanov, 1993) از جمله صید بی‌رویه از ذخایر این ماهیان، تخریب محل‌های زیست و تخم‌ریزی آنها، آلودگی رودخانه‌ها، وجود تأسیسات هیدرولیک و پل‌ها در مسیر مهاجرت این ماهیان، موجب

گردید که مناطق تکثیر طبیعی آنها کاهش یافته و در نتیجه تکثیر طبیعی جوابگوی تداوم حیات این ماهیان نباشد و نسل این گونه ماهیان با خطر انقراض روبرو شود. برای بازسازی ذخایر و بهره‌برداری پایدار، سالانه تعداد زیادی بچه ماهی خاویاری تولید و به دریا رهاسازی می‌گردد. تولید بچه ماهی طی عملیات تکثیر مصنوعی در مراکز تکثیر و پرورش تاسماهیان انجام می‌گیرد. هنگام تکثیر، وجود همزمان مولد نر و ماده رسیده امری الزامی است، اما گاهی بخصوص اواخر فصل تکثیر بدلیل کمبود مولد نر مناسب یا بعلت تأخیر در رسیدگی جنسی مولدین ماده، عملیات تکثیر با مشکل مواجه می‌شود. در چنین مواقعی می‌توان با تکنیک انجماد، تخمک‌ها را با اسپرم انجماد یافته بارور کرد یا اسپرم‌های مازاد را منجمد نموده تا در آینده مورد استفاده قرار گیرد.

یکی از روشهای حفاظت از اسپرم برای مدت طولانی، نگهداری آن در دماهای پایین است که به تکنیک انجماد اسپرم معروف می‌باشد. امروزه از این تکنیک برای محافظت و نگهداری اسپرم پستانداران از جمله در دامها (گاو، گوسفند، خوک، قوچ) ماکیان (خروس، بوقلمون) و انسان استفاده می‌شود و به صورت یک فعالیت روزمره درآمده است (نویری ۱۳۷۸).

نگهداری اسپرم جانوران برای نخستین بار با تحقیق Polge و همکارانش در سال ۱۹۴۹ با استفاده از گلیسرول برای محافظت اسپرم گاو، در مقابل اثر سرما و انجماد بوجود آمد. با این مطالعه یک گام اساسی در جهت حفاظت اسپرم حیوانات برداشته شد (قاسمی، ۱۳۷۷). آنها پی بردند با استفاده از ترکیبات خاص شیمیایی می‌توان از تشکیل کریستالهای یخ در اسپرم ها ممانعت بعمل آورد و در نتیجه اثر یخ زدگی سلول را تا حد زیادی کاهش داد.

فکر نگهداری اسپرم ماهیان توسط de Quaterfage با مطالعات اولیه در مورد افزایش طول عمر اسپرم در شرایط غیر انجماد انجام گرفت. در سال ۱۹۵۳، Blaxter اولین کسی بود که موفق به انجماد اسپرم ماهی هرینگ *Clupea harengus* با استفاده از محافظت کننده گلیسرول شد و ۸۵ درصد لقاح با اسپرم منجمد شده بدست آورد.

به جهت ساده‌تر بودن روش کار در مورد انواع ماهیان سردآبی در سال ۱۹۶۸، Idler and Hoyle در مورد سالمون‌های اقیانوس اطلس (*Salmo salar*) مطالعه کردند و از ضد یخ اتیلن گلیکول بجای گلیسرول در رقیق کننده استفاده کردند و توانستند ۱۲ درصد لقاح با اسپرم منجمد شده در ماهی آزاد آتلانتیک داشته باشند. پس

از آن محققین بسیاری پیرامون انواع آزاد ماهیان مطالعه نموده و طی تحقیقات پی در پی موفقیت آنها بیشتر گردید.

مطالعات پیرامون انجماد اسپرم ماهیان گرمابی، از دهه ۶۰ میلادی با تحقیقات Sneed و Clemens در سال ۱۹۵۶ آغاز گردید. آنها توانستند با انجماد اسپرم ماهی کپور معمولی ۲۰ درصد لقاح بدست آورند. Moczarski در سال ۱۹۶۷ با استفاده از مواد مختلف تا ۴۹ درصد لقاح با استفاده از اسپرم یخزده بدست آورد. همچنین تحقیقاتی در مورد لای ماهی *Tinca tinca* توسط Moczarski و Koldras در سال ۱۹۸۲ انجام شد. این دو محقق در سال ۱۹۸۳ اسپرم اردک ماهی *Esox lucius* را منجمد نموده و موفق شدند ۷۹ درصد لقاح بدست آورند. در همان سال، Kerby در مورد گونه *Morone saxitilis* مطالعه نمود که گونه‌ای گرمابی و مخصوص سواحل اقیانوس اطلس می باشد و ۸۷ درصد لقاح با اسپرم منجمد شده بدست آورد.

با پیشرفت تحقیقات در زمینه ماهیان گرمابی، Kurokura و همکارانش (۱۹۸۴) توانستند درصد تخمهای چشم زده بدست آمده از لقاح تخم ماهی کپور معمولی را با استفاده از اسپرم منجمد شده به ۶۸/۶ درصد برسانند که درصد موفقیت آنها بیشتر از Moczarski در سال ۱۹۷۷ بود.

آرنولد در سال ۱۹۱۵ نشان داد که اسپرم تاس ماهی ولگا در شرایط نگهداری در محل سرد در فلاکس یخ مدت نسبتاً طولانی زنده می ماند. در روز دوم، مقداری زیادی از اسپرماتوزوئیدها تلف می شدند ولی قسمتی از آنها طی دو روز کاملاً زنده می ماندند. اشمیت در سال ۱۹۳۵، اسپرم تاس ماهی ولگا را در حرارت ۴-۱ درجه سانتیگراد نگهداری نمود. در این شرایط اسپرماتوزوئیدها ۱۹-۱۲ روز و برخی تا ۲۱ روز زنده ماندند. از لقاح تخم تاسماهی با اسپرمی که به مدت ۱۲ روز نگهداری شده بود، نتیجه خوبی حاصل گردید. پرسوف در سال ۱۹۴۱، اسپرم ازون برون را در دمای ۳-۱ درجه سانتیگراد نگهداری نمود و نتیجه آن را از تعداد لاروهای ماهی مطالعه نموده که از لقاح با این اسپرم حاصل گردیده بود، اسپرم تا مدت نسبتاً طولانی (۱۱ روز) استعداد بارور نمودن خود را از دست نمی داد و نتایج ذیل حاصل گردید:

- ۱- تا ۶ روز مقدار لاروها از میزان معمولی کمتر نبود.
- ۲- در مدت بیشتر از ۶ روز لاروها بطور تصاعدی کمتر گردید.
- ۳- نگهداری اسپرم از مدت ۱۱-۹ روز در بهترین شرایط فقط لاروهای معدودی حاصل شد (آذری، ۱۳۵۳).

تاکنون تعداد محدودی آزمایش در خصوص انجماد اسپرم تاسماهیان انجام شده است. اولین تحقیق توسط Burstev و Serebryakova با استفاده از گلیسرول با غلظت های ۱۴-۵ درصد به همراه زرده تخم مرغ و ساکاروز به عنوان محافظ سرمایی، انجام شد.

Kopeika و همکارانش بهترین ماده محافظ سرمایی برای انجماد اسپرم تاسماهیان گونه بلوگا و استرلیاد را دی متیل سولفو کساید (DMSO)، اتیلن گلیکول و ساکاروز اعلام نمودند. اسپرم منجمد شده ازون برون با این روش، پس از ۲۲-۴ روز نگهداری در انجماد عمیق، ۶۰-۴۰ درصد تحرک گزارش شده و میزان لقاح اسپرم منجمد شده نسبت به شاهد  $8/8 \pm 64/1$  بود است.

Tsvetkova و همکارانش در سال ۱۹۹۶، با تحقیق پیرامون انجماد اسپرم دو گونه ماهی خاویاری *Acipenser baeri* و *A. ruthenus* توانستند ۲۳ درصد لقاح در ماهی استرلیاد و ۵۴ درصد لقاح در تاسماهی سبیری با استفاده از اسپرم منجمد شده بدست آورند.

همچنین در سال ۱۹۹۳ Cherepanov و همکارانش طی بررسی در مورد گونه های *Huso huso*، *A. gueldenstaedti* و *A. nudiventris* اعلام نمودند که می توان اسپرم این ماهیان را تا دو سال در انجماد عمیق نگهداری نمایند. در ایران آذری تاکامی در سال ۱۳۴۶، آزمایشهایی را به منظور نگهداری اسپرم ماهیان خاویاری در دماهای پایین در انستیتو ماهی شناسی ایران (بندر انزلی) انجام دادند.

در سال ۱۳۶۸، مطالعاتی در مورد شناخت بهترین رقیق کننده و بهترین درصد مواد در رقیق کننده ها برای انجماد اسپرم ماهیان خاویاری توسط میرزایی انجام شد و گزارش نمودند که فقط نمونه اسپرم های دارای کیفیت تحرک بالا، برای فرآیند انجماد استفاده گردد، همچنین بدلیل حساسیت زیاد اسپرم تاسماهیان نسبت به عوامل مکانیکی و عوامل فیزیکی مانند نور و حرارت، پیشنهاد نمودند تمامی آزمایشها بایستی در آزمایشگاهی مجهز با دمای و نور مناسب و با ملایمت انجام پذیرد (میرزایی، ۱۳۶۸).

عابدی در سال ۱۳۷۵، تحقیقی به منظور تعیین محیط کشت اختصاصی تاسماهیان انجام دادند. ایشان با استفاده از ماده محافظ سرمایی DMSO و انجماد در دمای ۱۹۶- درجه سانتیگراد گزارش نمودند که ۷۰-۶۰ درصد اسپرمها پس از انجمادزدایی دارای تحرک هستند. (عابدی، ۱۳۷۵)

قاسمی در سال ۱۳۷۶، تحقیقی با هدف تعیین روش انجماد و نگهداری اسپرم ماهی سفید دریای خزر انجام داد. در این بررسی دو هدف نگهداری کوتاه مدت و بلند مدت اسپرم ماهی سفید مورد ارزیابی قرار گرفت. براساس نتایج منتشر شده، اسپرم به روش فورگاسون و با رقیق کننده Kurokura با ۱۰ درصد دی متیل سولفو کساید و با نسبت ۱:۳ منجمد گردید و میزان ۸۲ درصد لقاح بدست آمد.

از جمله تحقیقات انجام گرفته در زمینه ماهیان گرمابی در ایران، طرح انجماد اسپرم ماهی کپور توسط نویری در سال ۱۳۷۷ است. در این پژوهش بهترین محفظه نگهداری اسپرم سرنگ انسولین با نسبت ۱:۱ با رقیق کننده Alsever گزارش گردید.

بررسی انجماد اسپرم ماهی قزل آلا توسط شکیبی در سال ۱۳۷۸ انجام گرفت. در این تحقیق قابلیت اسپرم در نگهداری کوتاه مدت پس از ۲۴ ساعت نگهداری در یخ خرد شده دارای ۶۸/۵ درصد لقاح و در نگهداری بلند مدت پس از یک ماه نگهداری در ازت مایع، ۳۸/۴ درصد اعلام گردید.

از نکات مهمی که در انجماد اسپرم باید به آن توجه نمود، عبارتند از:

- نگهداری اسپرم استحصال شده در درجه حرارت پایین تا حد امکان نزدیک صفر درجه تا قبل از رقیق سازی با محیط کشت انجام گیرد.

- حجم ظروف و محفظه های اسپرم جهت انجماد نباید زیاد باشد تا کل نمونه بطور یکنواخت سرد و منجمد شود.

- کلیه مراحل انجماد در کوتاهترین مدت زمان انجام شود (Stoss, 1983).

علاوه بر انجماد اسپرم، عده ای از محققین در مورد انجماد تخم و جنین برخی از گونه ها مطالعاتی انجام داده اند اما بدلیل بزرگی اندازه تخم و وجود لایه های خارجی دور تخم که خصوصیات فیزیولوژیک متفاوتی دارند موجب شده که این تکنیک در مورد نگهداری تخم برای مدت زمان طولانی پیشرفتی نداشته باشد. در سالهای اخیر، بر روی نگهداری جنین ماهیان تحقیقاتی انجام گرفته است. از آن جمله می توان به تحقیق Kopeika و Dybenko در سال ۱۹۹۳، پیرامون جنین ازون برون اشاره کرد. این محققین توانستند جنین ازون برون را تا مرحله ۳۲ سلولی برای مدت ۳ ساعت حفظ کنند اما پس از گرم کردن جنین ها، مراحل بعدی رشد و نمو جنینی در آنها مشاهده نگردید.

هرچند که تحقیقات در مورد حفظ و نگهداری سلولهای جنینی ماهیان هنوز در مراحل اولیه خود است، اما با کاربردهای بالقوه متنوعی که این تکنیک دارد می‌توان امیدوار بود که با تلاش و تحقیق بیشتر در این زمینه بتوان به حفظ گونه‌های موجود و دستیابی به زاده‌های بهتر اقدام نمود.

در رابطه با حفظ و نگهداری اسپرم، روشهای متنوعی توسط محققین پیشنهاد شده است که هر یک در مورد گونه بخصوصی کار کرده و موفقیت آنها مربوط به همان گونه و همان روش کار می‌باشد. بطور کلی، در تمامی آزمایش‌های انجماد ابتدا اسپرم‌های مناسب را از یک یا چند مولد انتخاب کرده و آن را با محیط کشت‌های مختلفی که اغلب حاوی ترکیبات آلی و غیر آلی هستند، به نسبت معین مخلوط نموده و سپس مواد محافظ سرمایی به آن اضافه می‌نمایند. پس از این عمل رژیم سرمایی مناسبی که طی آن کمترین شوک و آسیب به سلول‌ها وارد شود، اعمال شده و در انتها لوله‌های حاوی اسپرم‌ها انجماد یافته در کانتینرهای حاوی ازت مایع با برودت ۱۹۶ درجه سانتی‌گراد ذخیره می‌گردد. سپس نمونه‌های اسپرم منجمد شده از ازت مایع خارج شده و طی یک رژیم حرارتی ویژه، انجمادزدایی شده و جهت بررسی تحرک و آزمون لقاح از آن استفاده می‌شود.

انجماد اسپرم کاربردهای متعددی دارد که از آن جمله می‌توان به موارد ذیل اشاره نمود:

- ۱ - انجماد اسپرم گونه‌های که به علل مختلف نسل آنها در خطر انقراض است .
- ۲- با این تکنیک، هیبریدگیری بین گونه‌ها یا نژادهای نزدیک امکان پذیر خواهد شد که درفصول مختلف به رسیدگی جنسی می‌رسند و تکثیر آنها بطور معمول در طبیعت دیده نمی‌شود، امکان پذیر خواهد شد
- ۳- انجماد اسپرم موجب کاهش هزینه‌های صید، انتقال و نگهداری تعداد زیاد مولدین در مراکز تکثیر و پرورش خواهد شد.

۴- ایجاد مجموعه گامت و جنین منجمد ( ویلوت و همکاران، ۱۹۹۷ ) این امر را امکان پذیر می‌سازد تا با کمک تکنیک آندروژنز یا آمیزش جانشینی، در هر زمان ژنوم تاسماهی در اختیار باشد حتی در مواقعی که گونه ماده یا نر در دسترس نباشند

به دلیل اهمیت انجماد اسپرم در حفاظت و جلوگیری از انقراض نسل گونه‌های تاسماهیان دریای خزر، این پژوهش با هدف کاربرد متدهای انجماد بدست آمده در مورد سایر تاسماهیان برای انجماد اسپرم ماهیان خاویاری حوضه جنوبی دریای خزر مطرح گردید.

اهداف اصلی این تحقیق عبارتند از :

- ۱ - بررسی کمی و کیفی اسپرم در تاسماهیان قبل و بعد از انجماد
- ۲ - بررسی مناسب ترین محفظه نگهداری اسپرم طی انجماد
- ۳ - بررسی محیط کشت مناسب در انجماد اسپرم ماهیان خاویاری
- ۴ - ارزیابی درصد لقاح تخمک با استفاده از اسپرم منجمد شده



## ۲- مواد و روش‌ها

### ۲-۱- مواد و روش کار

در این پروژه، اسپرم ماهیان خاویاری از مولدین صید شده در مرکز تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری شهید مرجانی آق‌قلا گرگان و مجتمع تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری شهید بهشتی سد سنگر رشت، همچنین مولدین صید شده در صیدگاه جفرود تامین گردید. کلیه عملیات آزمایشگاهی و مراحل انجماد در آزمایشگاه انجماد اسپرم بخش ژنتیک انستیتو تحقیقات ماهیان خاویاری انجام شد.

به منظور رسیدگی جنسی، ابتدا مولدین صید شده به میزان ۲-۳ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن مورد تزریق هیپوفیز قرار گرفت، پس از ۱۵-۲۴ ساعت با توجه به میزان درجه حرارت آب، اسپرم استحصال گردید (شکل ۱).

آزمایشهای کمی و کیفی تحرک اسپرم و انجام مراحل انجماد، از ۱۲ عدد ماهی مولد نر تاسماهی ایرانی، ۷ مولد نر ازون برون، ۵ مولد نر شیب و ۳ مولد نر فیل ماهی، اسپرم‌گیری گردید.



شکل ۱- تزریق هورمون هیپوفیز به مولدین جهت رسیدگی جنسی

#### ۲-۱-۱- روش اسپرم‌گیری

اسپرم‌گیری از مولدین تاسماهی و فیل ماهی، بعد از انتخاب ماهی نر رسیده با وارد کردن چند ضربه به سر ماهی بیهوش می‌گردد. برای اسپرم‌گیری از مولدین کوچک، ابتدا محوطه مجرای تناسلی و شکمی، با پارچه کاملاً

خشک شده و با فشار در ناحیه کمر ماهی، اسپرم از منفذ تناسلی با فشار در ظرف آلومینیومی جمع آوری شد. برای استحصال اسپرم از مولدین نر بزرگتر، از سرنگ ۵۰ میلی لیتری متصل به تیوپ پلاستیکی (Tygon) استفاده شد (شکل ۲).



شکل ۲- اسپرم گیری از مولدین در استخرهای کورانسکی

اسپرم آلوده شده به مواد دفعی و ادرار یا خون مورد آزمایش قرار نگرفتند (Linhart, 1993). اسپرم استحصالی درون ظروف درب دار خنک ریخته شده و بسرعت به یخچال آزمایشگاه انجماد اسپرم در دمای  $+5^{\circ}\text{C}$  درجه سانتیگراد منتقل گردید.

#### ۲-۱-۲- ارزیابی تحرک اسپرم تازه

اسپرم بسیاری از ماهیان در دستگاه تناسلی بی حرکت است و تنها بعد از رها سازی در محیط خارجی فعال می شوند (Scott and Bynes, 1980). اسپرم ماهیان خاویاری در پلاسمای منی بدون تحرک بوده و تنها تعداد کمی از گامت ها متحرک هستند. اما بعد از رقیق شدن در آب یا محلول فعال کننده حاوی ۱۰ میلی مول کلرید سدیم و ۲۰ میلی مول تریس، صد درصد دارای حرکت می شوند (Linhart, 1995). عوامل محیطی از قبیل یونها، pH و فشار اسمزی می توانند غشاء سلولی اسپرم را هیپرپلازیز کرده و اسپرم را تحریک کنند (Morisawa et al., 1983).

برای بررسی پارامتر تحرک اسپرم، ۵ میکرولیتر از آن را با میکروسپرلر برداشته، بلافاصله بعد از جمع آوری و بدون رقیق کردن، مستقیماً روی یک اسلاید شیشه ای قرارداده و در زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی  $\times 200$  ارزیابی گردید. برای مشاهده دقیق گامت نر از زمینه تاریک میکروسکوپ استفاده شد.

## ۳-۱-۲- ارزیابی کیفی و مدت زمان تحرک اسپرم

کیفیت اسپرم با توجه به چگونگی حرکت اسپرماتوزوئیدها تعیین می‌گردد. جهت انتخاب اسپرم مناسب در آزمایش‌های اصلی، میزان تحرک اسپرم‌ها به عنوان شاخص در نظر گرفته شد (نویری و همکاران، ۱۳۷۸). در تخمین چشمی، تعداد سلولهای متحرک اسپرماتوزوئید، سرعت آنها و نوع حرکت آنها بررسی گردید (Kopeika, 2000).

پس از رقیق شدن اسپرم با آب معمولی با رقت ۵۰ برابر، درصد و کیفیت تحرک اسپرم‌ها با میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ( $\times 400$ ) در زمینه تاریک تخمین زده شد (Linhart, 1993).

در این بررسی ابتدا یک لام تمیز را در زیر میکروسکوپ نوری قرار داده و فاصله عدسی شیئی تا صفحه نگهدارنده لام تنظیم شد و دریچه دیافراگم نوری در وضعیت حداقل قرار گرفته تا به اصطلاح صفحه تاریک میکروسکوپ تشکیل شود. مشاهده اسپرم تاسماهیان با توجه به حداقل اندازه اسپرماتوزوئید در این گونه‌ها با ۴۷ میکرون در ماهی ازون‌برون، با بزرگنمایی  $\times 200$  و  $\times 400$  امکانپذیر می‌باشد. اما با بزرگنمایی  $\times 400$  وضوح و بررسی اسپرم‌ها آسانتر است. با دستگاه میکروسمپلر ۵۰ میکرولیتر آب (آب مورد استفاد در مراکز تکثیر) روی لام گذاشته شد و یک میکرولیتر اسپرم به آن اضافه گردید. بلافاصله با یک لامل، اسپرم و آب را هم زده و لامل بر روی مخلوط قرار داده شد. در این بررسی تعداد سلولهای متحرک اسپرماتوزوئید (درصد تحرک) و سرعت و نوع حرکت آنها (کیفیت تحرک) به روش تخمین چشمی مورد ارزیابی قرار گرفت. (Drokin et al., 1997)

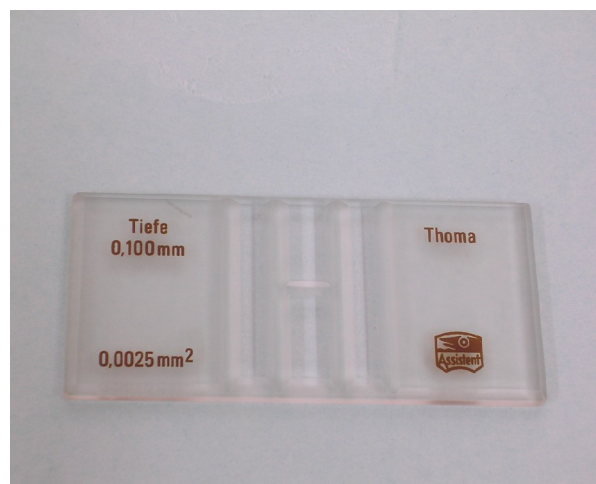
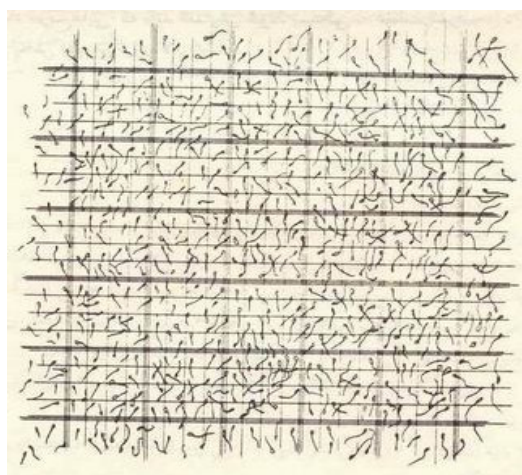
نمونه‌های که توده زیادی از اسپرم‌ها دارای حرکت سریع و نامشخص باشند نمونه با کیفیت خوب، نمونه‌هایی که توده زیادی از اسپرم‌ها دارای حرکت سریع باشند ولی حرکت تک تک اسپرم‌ها قابل مشاهده باشد نمونه با کیفیت متوسط و نمونه اسپرم‌هایی که حدود ۵۰ درصد از اسپرم‌ها دارای حرکت کند و مشخص باشد، نمونه‌ای با کیفیت ضعیف در نظر گرفته شده است.

در بررسی مدت زمان تحرک اسپرم، ۱۰ میکرولیتر اسپرم با ۴۹۰ میکرولیتر آب روی لام گذاشته شد و مخلوط را با لامل کاملاً هم زده سپس با میکروسکوپ با بزرگنمایی  $\times 400$ ، مدت زمان تحرک اسپرم‌ها ارزیابی گردید. در این بررسی بلافاصله پس از مخلوط نمودن و از لحظه تماس اسپرم با آب، زمان تحرک اسپرم‌ها با استفاده از کروномتر دیجیتال محاسبه شد.

#### ۴-۱-۲- ارزیابی کمی اسپرم

جهت تعیین تراکم اسپرماتوزوئید (تعداد اسپرم در یک حجم مشخص مثلاً ۱ میلی لیتر) از لام هموسیتمتر استفاده شد. (هاشمی، ۱۳۷۷). ابتدا لام هموسیتمتر با الکل کاملاً تمیز کرده و سپس کاملاً خشک می گردد. آنگاه ۲۰ میکرولیتر اسپرم را در ۴ میلی لیتر سرم فیزیولوژیک مخلوط کرده و خوب هم زده شد تا اسپرم ها بطور یکنواخت پخش گردند. یک قطره از اسپرم رقیق شده را با پیت پاستور بین لام هموسیتمتر و لامل ریخته، بصورتی که تمام سطح زیر لامل را فرا گیرد، محلول بر اثر خاصیت موئینگی (Capillarity) بین آن دو نفوذ کرده و سطح مربع ها را می پوشاند. سپس لام هموسیتمتر را در زیر میکروسکوپ قرار داده پس از گذشت ۱۰ دقیقه، برای پراکنش یکنواخت اسپرم ها، با بزرگنمایی  $\times 400$ ، در زیر میکروسکوپ شمارش گردید. بدین ترتیب که از بین کل خانه های موجود (۲۵ خانه) ۵ خانه به اختیار و بطور تصادفی انتخاب شده و تعداد اسپرم های قرار گرفته در آن شمارش می گردد. در ضمن، اسپرم هایی واقع در روی اضلاع، فقط در دو ضلع از چهار ضلع شمارش می شوند. این دو ضلع را می توان به دلخواه انتخاب نمود (شکل ۳).

عدد بدست آمده از شمارش ۵ خانه را در فرمول ذیل قرار داده و مقدار کل اسپرم محاسبه می شود. طبق بررسیهایی بعمل آمده در خصوص میزان خطا شمارش با این روش، برای ارزیابی کمی اسپرم در پستانداران  $\pm 20$  برآورد شده است (هاشمی، ۱۳۷۷).



شکل ۳ - لام هموسیتمتر نمایی از پراکنش اسپرم در خانه های آن

$$X = \frac{A(4000 \times 200)}{80}$$

A = تعداد اسپرم شمارش شده در لام هموسیتمتر

4000 = حجم خانه‌های لام      200 = درصد رقت محلول

80 = تعداد خانه‌های شمارش شده      x = تعداد کل اسپرم‌ها در یک میلی مترمکعب

پس از بررسی کمی و کیفی اسپرم استحصالی، نمونه اسپرم‌های با کیفیت خوب و تراکم مناسب با محیط کشت به نسبت ۱:۱ مخلوط گردید و به مدت دو ساعت در یخچال معمولی قرار داده شد.

#### ۵-۱-۲- رقیق کننده (محیط کشت)

رقیق کننده حاوی ترکیبی از نمک‌ها، مواد محافظ سرمایی و آنتی بیوتیک می‌باشد. دو محلول رقیق کننده مورد استفاده در این تحقیق شامل: محلول (Cryopreservation Medium) که ترکیب شیمیایی آن شامل: ۱۱۸ میلی مول تریس با pH=8، ۲۳/۴ میلی مول ساکارز، ۲۰ درصد زرده تخم مرغ، ۱۵ درصد ماده محافظ سرمایی دی‌متیل سولفوکساید و ۵۰۰ واحد آنتی بیوتیک پنی سیلین G در هر میلی لیتر بود (Tesvetkova, 1996). همچنین محلول آماده (Biociphus) ساخت شرکت (IMV) که به عنوان رقیق کننده اسپرم دام، کاربرد فراوانی دارد. این محلول محتوی نمک‌های تغلیظ شده، ساکارز، زرد تخم گیاهی و ماده محافظ سرمایی گلیسرول است.



شکل ۴- مراحل تهیه محیط کشت



جهت تهیه ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت (CM)، ۱/۴۲۹ گرم تریس با ۰/۸۰۰ گرم ساکارز، پس از توزین با ترازوی حساس (۰/۰۰۱ گرم) در ۶۵ میلی لیتر آب مقطر دوبار تقطیر، اضافه گردید و pH محلول با اسید کلریدریک بر روی ۸ تنظیم شد. زرده تخم مرغ پس از دو مرحله جداسازی، ابتدا سفیده تخم مرغ از زرده جدا نموده، سپس در مرحله بعد با استفاده از کاغذ صافی، پوسته دورتا دور زرده به نام شالاز گرفته می شود.

۲۰ سی سی زرده تخم مرغ تهیه شده با محلول حاوی تریس و ساکارز مخلوط شده و در انتها ۱۵ سی سی دی متیل سولفو کساید (DMSO) به آن اضافه گردید و به مدت ۱۰ دقیقه با دستگاه همزن الکتریکی مخلوط شد تا محلول بصورت کاملاً همگن در آید. در انتها برای جلوگیری از رشد میکروبی در رقیق کننده، به میزان ۵۰۰ واحد آنتی بیوتیک پنی سیلین به ازاء هر میلی لیتر به آن اضافه گردید (شکل ۴).

محلول محیط کشت و ظروف حاوی اسپرم استحصال شده، بطور جداگانه به مدت نیم ساعت در یخچال با دمای ۵ درجه سانتی گراد قرار داده شد تا دمای هر دو یکسان شود. سپس به نسبت ۱ : ۱ (یک حجم اسپرم و یک حجم محیط کشت) با یکدیگر مخلوط گردید. اسپرم رقیق شده برای رسیدن به تعادل اسمزی و تاثیر مواد رقیق کننده بر سلولهای اسپرم، به مدت ۱ ساعت در یخچال با دمای ۵ + قرار داده شد

#### ۶-۱-۲- ظروف انجماد اسپرم (cryotube)

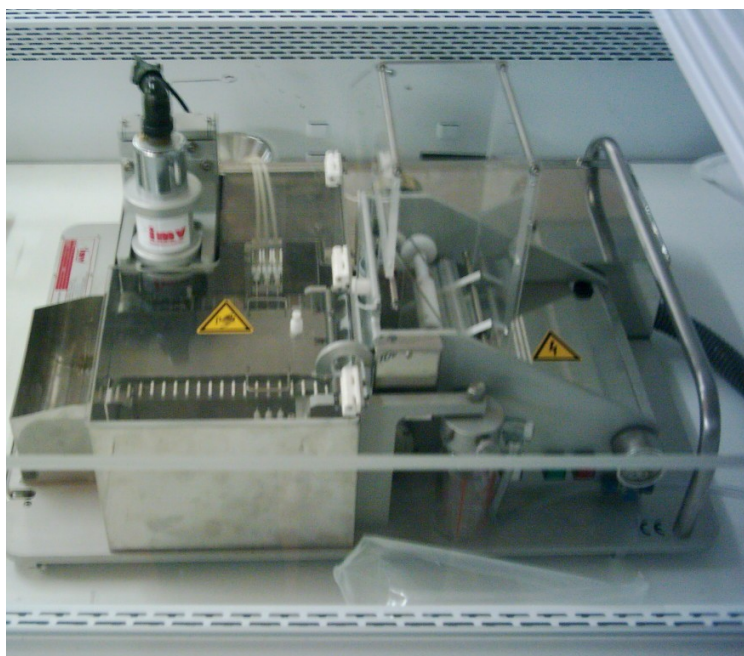
ظروف و محفظه های (کرایوتیوب) ذخیره اسپرم رقیق شده در آزمایشهای انجماد اسپرم، شامل پایوت (straw) با حجم نیم میلی لیتر (۰/۵ ml) ساخت شرکت IMV فرانسه و سرنگ انسولین با حجم یک میلی لیتر ساخت شرکت سوپا ایران بود (شکل ۵).

برای پر کردن پایوت، از دستگاه اتوماتیک سه سوزنه sealing و filling (شرکت IMV فرانسه) استفاده گردید. این دستگاهها با ایجاد مکش از طریق لوله هایی، اسپرم رقیق شده را بداخل پایوت مکیده و سر دیگر پایوت با مسدود کننده حرارتی بسته می شود (شکل ۶).

تمامی مراحل پر کردن ظروف و بسته بندی آنها در داخل دستگاه کابینت سرمایی (مدل ۵۳۰۰) انجام گردید. دستگاه کابینت با تولید سرما، دمای محوطه نگهداری محلولها، ظروف و دستگاه بسته بندی را در حد ۵+ درجه سانتی گراد حفظ نموده و از تغییرات دمایی محیط بر اسپرم رقیق شده جلوگیری می نماید (شکل ۷).



شکل ۵- انواع محفظه انجماد cryotube



شکل ۶- دستگاه اتوماتیک سه سوزنه filling و sealing



شکل ۷ - دستگاه کابینت سرمایی (مدل ۵۳۰۰)

جهت پر کردن سرنگ انسولین، سر سرنگ را در داخل بشر حاوی اسپرم رقیق شده فرو کرده با ایجاد مکش، سرنگ پر شده و سر باز آن را با خمیر مخصوص، مسدود می‌گردد.

#### ۷-۱-۲- روش انجماد

پس از پر کردن ظروف ذخیره (کرایوتیوب) از اسپرم رقیق شده، سرنگ‌ها و پایوت‌ها را روی ریل های فلزی مخصوص (Rack) چیده شده و رک‌ها با سرعت به دستگاه فریزر خودکار (مدل ۵۳۰۰) منتقل می‌گردد. قبل از شروع مراحل سرمادهی، یکی از پایوت‌ها را بطور تصادفی برداشته و به عنوان پروب به میله ترموکوبل دستگاه فریزر متصل می‌گردد. توسط این پروب کلیه تغییرات و نوسانات درجه حرارت پایوت‌ها در تمام مراحل سرمادهی، مستقیماً توسط مونیتور گزارش شده و در حافظه کامپیوتر ذخیره می‌گردد (شکل ۷). برای انجماد پایوت‌های حاوی اسپرم رقیق شده، از برنامه انجماد کامپیوتری سه مرحله‌ای به شرح ذیل استفاده شد (شکل ۸).

۱ - شروع انجماد از +۵ به -۱۰ درجه سانتیگراد با سرعت ۳ درجه سانتیگراد در دقیقه

۲ - از -۱۰ تا -۷۰ درجه سانتیگراد با سرعت ۲۰ درجه سانتیگراد در دقیقه

۳ - از -۷۰ تا -۱۳۰ درجه سانتیگراد با سرعت ۲۵ درجه سانتیگراد در دقیقه





شکل ۷ - دستگاه فریزر خودکار (مدل ۵۳۰۰)

پس از طی مراحل انجماد و رسیدن برودت پایوت ها به ۱۳۰ - درجه سانتیگراد، پایوت ها از روی رک ها جمع آوری شده، پس از علامت گذاری و تفکیک اسپرم گونه های مختلف ماهیان خاویاری در کانال های مجزا و در کانتینرهای ازت مایع ۱۵ لیتری و ۳۵ لیتری (MVE Cryogenics, USA) با برودت ۱۹۶- درجه سانتی گراد ذخیره و برای مدت طولانی نگهداری گردید.



شکل ۸ - برنامه انجماد کامپیوتری

#### ۸-۱-۲- ذوب و انجمادزدایی Thawing

برای بررسی کیفیت اسپرم منجمد، دو ساعت بعد از قراردادن پایوت در ازت مایع، دو عدد پایوت حاوی اسپرم منجمد از کانتینرهای ازت مایع با برودت ۱۹۶- خارج نموده و به مدت ۲۵ ثانیه در آب گرم ۴۰ درجه سانتیگراد گذاشته شد تا به حالت مایع درآید. به محض مشاهده حباب در پایوت، آن را از آب خارج نموده و با پارچه خشک می‌گردد. برای انجمادزدایی سرنگ انسولین بدلیل ضخیم بودن دیوار از آب ۴۰ درجه به مدت ۴۰ ثانیه استفاده گردید (شکل ۹).

مطابق روش ارزیابی اسپرم تازه، ۵۰ میکرولیتر آب با میکروسپلر روی لام ریخته و دو میکرولیتر اسپرم رقیق‌شده، به آن اضافه می‌گردد (با رقت ۵۰ برابر) سپس در زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی (۴۰۰×) کیفیت اسپرم منجمد شده مورد بررسی قرار گرفت.



شکل ۹ - انجماد زدایی اسپرم منجمد در آب با دمای ۴۰ درجه سانتیگراد

#### ۹-۱-۲- لقاح تخم

نمونه اسپرم های منجمد شده برای لقاح حداقل یک هفته در ازت مایع قرار گرفت. برای انجام آزمایش های تخمک با اسپرم منجمد شده مطابق روش متداول به نسبت ۱۰۰ گرم تخم تاسماهیان، یک سی سی اسپرم تازه و فعال است که با توجه به افت کیفیت و درصد تحرک اسپرم طی مراحل انجماد، می‌بایست میزان اسپرم منجمد شده بیشتری استفاده شود. در آزمایشهای لقاح برای تلقیح ۱۰۰ گرم تخم از سه میلی‌لیتر اسپرم خالص معادل

۱۲ پایوت نیم میلی‌لیتری یا ۶ عدد سرنگ انسولین یک سی‌سی (به میزان سه برابر بیش از حد معمول با اسپرم تازه) استفاد گردید.

قابلیت لقاح در اسپرم های انجمادزدایی شده با استفاده از تخم های حداقل سه مولد ماده مورد ارزیابی قرار گرفت و تخمک های مولدین در اوزان ۱۰۰ گرمی به چهار قسمت مساوی تقسیم شده و سه قسمت با استفاده از اسپرم های انجماد زدایی شده و یک قسمت با اسپرم تازه لقاح داده شد. پس از طی ۵ دقیقه از هم زدن تخمک به روش لقاح نیمه خشک، برای رفع چسبندگی تخم‌ها، از مخلوط آب و گل و رس غلیظ استفاده گردید. این مخلوط به مدت ۳۵ دقیقه با تخم لقاح یافته هم زده شده سپس تخم‌ها با آب تمیز کاملاً شسته شده و درانکوباتور یوشنکو ریخته شد تا مراحل تقسیمات جنینی انجام پذیرد و تخم‌ها به لارو تبدیل شود. نتایج لقاح براساس تقسیمات جنینی در مرحله چهار تایی در ۴ تا ۵ ساعت بعد از لقاح ارزیابی گردید.

#### ۱۰-۱-۲- محاسبات آماری

در این بررسی از نرم افزار SPSS و Excele 2000 جهت طبقه بندی اطلاعات و به کمک آزمون آماری T-test و آنالیز واریانس یکطرفه (One way Anova) و آزمون توکی (Tukey) جهت تشخیص وجود یا فقدان اختلاف معنی‌دار یک پارامتر با تیمار مورد نظر و همچنین نرم افزار Word 2000 جهت تایپ گزارش نهایی طرح استفاده گردید.

### ۳- نتایج

#### ۳-۱- ارزیابی اسپرم تازه تاسماهی ایرانی *A. persicus*

با مشاهده مستقیم گامت جنسی نر، در زمینه تاریک میکروسکوپ نوری، مشخص گردید که تقریباً تمامی سلولهای اسپرم در مایع سمینال غیرمتحرک بوده و پس از رقیق کردن با آب، درصد بالایی از اسپرم ها تحرک داشتند. در همین بررسی در مورد اسپرم منجمد، مشخص گردید که درصد تحرک اسپرم منجمد شده بعد از انجمادزادی، بطور قابل ملاحظه‌ای کاهش یافته و بعضی از صدمات و آسیب‌های سلولی در اسپرم‌ها شامل شکستن موضعی و خمیدگی شدید در رشته مرکزی فلاژل در زیر میکروسکوپ مشاهده گردید. همچنین نمونه اسپرم‌هایی که کیفیت و درصد تحرک کمی داشتند، پس از انجام مراحل انجماد و ذوب، فاقد تحرک یا دارای درصد تحرک ضعیف بودند.

#### ۳-۱-۱- نتایج ارزیابی کیفی و مدت زمان تحرک اسپرم

در بررسی ۱۲ نمونه اسپرم استحصال شده از نظر کیفیت تحرک، ۵ نمونه دارای تحرک خوب و ۵ نمونه دارای تحرک متوسط و ۲ نمونه دارای کیفیت تحرک ضعیف مشخص گردید (جدول شماره ۱). در اسپرم تازه بیشترین درصد تحرک انبوه سلولهای جنسی در ۳/۵ دقیقه اولیه پس از فعال شدن مشاهده شد و به تدریج، درصد تحرک آنها بطور تصاعدی کاهش یافت. بطوریکه پس از گذشت ۵/۵ دقیقه بیش از ۹۰ درصد اسپرم‌ها فاقد هر گونه حرکتی بودند.

در اسپرم منجمد، بیشترین درصد تحرک انبوه سلولهای جنسی پس از فعال شدن، در ۲/۵۵ دقیقه اولیه مشاهده شد و تحرک ۹۰ درصد اسپرم‌ها پس از ۴ دقیقه متوقف گردید.

#### ۳-۱-۲- تراکم اسپرم در گونه تاسماهی ایرانی

میانگین تراکم اسپرم در دوازده نمونه جمع آوری شده از تاسماهی ایرانی با استفاده از لام هموسیتر،  $10^9 \times 2/22$  عدد سلول تخمین زده شد. حداقل تراکم اسپرم،  $10^9 \times 1/32$  گامت و حداکثر تراکم  $10^9 \times 3/44$  عدد سلول در هر سی‌سی محاسبه گردید. (جدول شماره ۱)

جدول ۱- تراکم اسپرم در تاسماهی ایرانی در هر میلی لیتر

شماره ماهی	تعداد اسپرم ( $\times 10^9$ )	کیفیت اسپرم	شماره ماهی	تعداد اسپرم ( $\times 10^9$ )	کیفیت اسپرم
۱	۱/۳۳	خوب	۷	۲/۲۹	ضعیف
۲	۲/۰۸	متوسط	۸	۱/۴۲	ضعیف
۳	۳/۴۲	متوسط	۹	۲/۶۹	خوب
۴	۲/۷۰	متوسط	۱۰	۲/۲۷	خوب
۵	۲/۸۷	متوسط	۱۱	۳/۴۴	خوب
۶	۲/۸۱	متوسط	۱۲	۱/۹۵	خوب

## ۳-۱-۳- درصد تحرک اسپرم تازه و منجمد شده با استفاده از محیط کشت (CM)

میانگین درصد تحرک اسپرم تازه در تاسماهی ایرانی، ۸۷ درصد و درصد تحرک اسپرم منجمد شده در همین گونه پس از انجمادزدایی، ۳۲ درصد برآورد گردید. درصد تحرک اسپرم منجمد شده بطور معناداری کمتر از درصد تحرک اسپرم تازه (شاهد) بود.

## ۳-۱-۴- درصد لقاح در اسپرم تازه و اسپرم منجمد شده در تاسماهی ایرانی با محیط کشت (CM)

میانگین درصد تحرک اسپرم تازه ( $n=5$ )  $86 \pm 5$  درصد بود و میزان تحرک اسپرم منجمد پس از انجمادزدایی  $32 \pm 4$  درصد محاسبه شد.

در آزمایش لقاح مصنوعی تخمک با اسپرم بر اساس جدول شماره ۲، میانگین درصد لقاح در اسپرم تازه (شاهد)  $90 \pm 3$  درصد و میانگین درصد لقاح با اسپرم منجمد شده در محفظه پایوت  $31 \pm 7$  درصد و با سرنگ انسولین  $30 \pm 6$  درصد ارزیابی شد.

جدول شماره ۲- بررسی درصد تحرک و لقاح در اسپرم تازه و منجمد در محفظه سرنگ و پایوت

تراکم اسپرم (cc/۱۰ <sup>۹</sup> )	درصد لقاح با اسپرم انجمادزدایی شده (CM)		درصد تحرک اسپرم منجمد با محیط کشت (CM)	درصد لقاح با اسپرم انجمادزدایی شده		درصد تحرک اسپرم منجمد با محیط کشت (Biociphus)	درصد لقاح با اسپرم تازه	درصد تحرک اسپرم تازه
	پایوت	سرنگ		پایوت	سرنگ			
۲/۶۹	۲۵	۲۳	۳۰	۰	۰	۳	۸۶	۸۵
۲/۲۷	۳۳	۳۵	۳۵	//	//	۷	۹۲	۹۰
۳/۴۴	۳۱	۲۸	۳۰	//	//	۵	۹۰	۸۵
۱/۹۵	۲۲	۲۶	۲۵	//	//	۵	۸۸	۸۰
۱/۳۲	۴۴	۴۰	۴۰	//	//	۶	۹۴	۹۵

### ۳-۱-۵- درصد تحرک و لقاح اسپرم منجمد شده در تاسماهی ایرانی با محیط کشت (Biociphus)

درصد تحرک اسپرم رقیق شده قبل از فرآیند انجماد سه مرحله‌ای در حدود ۵ درصد برآورد گردید.

براساس مشاهدات بعمل آمده، اسپرم‌های منجمد شده پس از انجمادزدایی، هیچگونه حرکتی نداشتند.

آزمایش لقاح تخمک و اسپرم منجمد شده با محیط کشت (Biociphus)، حدود صفر درصد برآورد گردید.

### ۳-۲- ارزیابی اسپرم تازه در ماهی ازون برون *Acipenser stellatus*

در بررسی اسپرم ماهی ازون برون با میکروسکوپ نوری تقریباً همه سلول‌های در مایع سمینال بدون حرکت

است و پس از رقیق کردن اسپرم به نسبت ۱:۵۰ با آب در جهات مختلف شروع به حرکت می‌نمایند. درصد و

کیفیت تحرک اسپرم منجمد شده پس از انجماد زدایی نسبت به اسپرم تازه بطور قابل ملاحظه‌ای کمتر است.

#### ۳-۲-۱- نتایج ارزیابی کیفی و مدت زمان تحرک اسپرم:

در بررسی ۷ نمونه اسپرم استحصال شده از نظر کیفیت تحرک، ۲ نمونه دارای تحرک خوب و ۳ نمونه

دارای تحرک متوسط و ۲ نمونه دارای کیفیت تحرک ضعیف مشخص گردید (جدول شماره ۳).

در اسپرم تازه، بیشترین درصد تحرک انبوه سلولها در ۲/۴۵ دقیقه اولیه پس از فعال شدن است و بتدریج درصد تحرک اسپرم بطور تصاعدی کاهش یافت بطوریکه پس از گذشت ۴/۳۰ دقیقه، بیش از ۹۰ درصد سلولهای جنسی فاقد هر گونه حرکتی است و باقیمانده سلولها دارای حرکت کند هستند.

اسپرم های منجمد شده پس از ذوب شدن در آب گرم ۴۰ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵-۲۵ ثانیه، حداکثر جمعیت متحرک رو به جلو در ۲/۲۵ دقیقه اولیه مشاهده شد و تحرک ۹۰ درصد اسپرم ها پس از ۳/۳۰ دقیقه متوقف گردید.

### ۲-۲-۳- تراکم اسپرم در گونه ازون برون

میانگین تراکم اسپرم ۷ نمونه جمع آوری شده در ماهی ازون برون با استفاده از لام هموسیئومتر و بررسی میکروسکوپی با بزرگنمایی (۴۰۰×)،  $10^9 \times 2/21$  بوده است. حداقل تراکم اسپرم  $10^9 \times 1/55$  و حداکثر تراکم  $10^9 \times 3/12$  در هر سی سی محاسبه گردید.

### جدول شماره ۳- تراکم اسپرم در ماهی ازون برون در هر میلی لیتر

شماره ماهی	تعداد اسپرم ( $\times 10^9$ )	کیفیت اسپرم	شماره ماهی	تعداد اسپرم ( $\times 10^9$ )	کیفیت اسپرم
۱	۳/۱۲	خوب	۵	۲/۴۶	ضعیف
۲	۱/۹۵	متوسط	۶	۲/۲۵	متوسط
۳	۲/۵۹	خوب	۷	۱/۲۵	متوسط
۴	۱/۸۸	ضعیف			

### ۳-۲-۳- درصد تحرک اسپرم تازه و منجمد شده با محیط کشت (CM)

میانگین درصد تحرک اسپرم تازه ۷۳ درصد تحرک اسپرم در آزمایش انجماد و تست لقاح پس از انجمادزدایی، ۳۷ درصد بوده است که بطور مشخص کمتر از نمونه شاهد (۸۰) است.

### ۳-۲-۴- لقاح در اسپرم تازه و اسپرم منجمد شده در ازون برون با محیط کشت (CM)

میانگین درصد تحرک اسپرم تازه  $73/75 \pm 6$  (n = ۴) درصد بود و میزان تحرک اسپرم منجمد پس از انجمادزدایی با استفاده از رقیق کننده (CM)  $37/5 \pm 5/5$  محاسبه شد.

در آزمایش لقاح مصنوعی تخمک با اسپرم بر اساس جدول شماره (۴) میانگین درصد لقاح در اسپرم تازه (شاهد)  $72 \pm 2/4$  درصد و میانگین درصد لقاح با اسپرم منجمد شد در پایوت  $34/6 \pm 8$ ، و در سرنگ انسولین  $39 \pm 5/5$  درصد ارزیابی شد.

درصد تحرک اسپرم منجمد شده بطور معناداری کمتر از درصد تحرک اسپرم تازه (شاهد) است.

#### جدول شماره ۴ - بررسی درصد تحرک و لقاح در اسپرم تازه و منجمد در محفظه سرنگ و پایوت

تراکم اسپرم (cc/۱۰ <sup>۹</sup> )	درصد لقاح با اسپرم انجمادزدایی شده (CM)		درصد تحرک اسپرم منجمد با محیط کشت (CM)	درصد لقاح با اسپرم انجمادزدایی شده		درصد تحرک اسپرم منجمد با محیط کشت (Biociphus)	درصد لقاح با اسپرم تازه	درصد تحرک اسپرم تازه
	پایوت	سرنگ		پایوت	سرنگ			
۳/۱۲	۴۸	۴۳	۴۵	۰	۰	۱۰	۷۶	۸۰
۲/۵۹	۴۵	۴۴	۳۵	//	//	۸	۷۲	۷۵
۲/۲۵	۳۵	۳۰	۳۰	//	//	۱۲	۷۰	۶۵
۱/۸۸	۳۲	۳۹	۴۰	//	//	۱۵	۷۰	۷۵

#### ۵-۲-۳- درصد تحرک و لقاح اسپرم منجمد شده در ماهی ازون برون با محیط کشت (Biociphus)

نمونه اسپرم ماهی ازون برون به نسبت ۱:۱ در محیط کشت Biociphus رقیق شده و میزان تحرک اسپرم رقیق شده قبل از انجماد بررسی گردید. درصد تحرک اسپرم رقیق شده کمتر از ۱۰ درصد محاسبه شد و سپس در محفظه‌های نیم میلی‌لیتری (پایوت) و سرنگ انسولین ذخیره گردید.

بر اساس مشاهدات بعمل آمده، اسپرم منجمد شده پس از انجمادزدایی فاقد هرگونه حرکتی بود. نتیجه آزمایش لقاح تخمک با اسپرم رقیق شده با محیط کشت (Biociphus) در حد صفر درصد ارزیابی گردید.



### ۳-۳-۳- ارزیابی اسپرم تازه در ماهی شیب *Acipenser nudiventris*

پس از مشاهده اسپرم ماهی شیب با میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی  $\times 400$  مشخص گردید که همه گامت‌ها در مایع منی بدون حرکت است و پس از اضافه کردن آب، اکثر اسپرم‌ها دارای حرکت می‌شوند. براساس مشاهدات، درصد و کیفیت تحرک اسپرم منجمد شده پس از انجماد زدایی نسبت به اسپرم تازه بطور قابل ملاحظه‌ای کمتر است.

#### ۳-۳-۳-۱- نتایج ارزیابی کیفی و مدت زمان تحرک اسپرم

در بررسی ۵ نمونه اسپرم استحصال شده از نظر کیفیت تحرک، ۲ نمونه دارای تحرک خوب و ۲ نمونه دارای تحرک متوسط و ۱ نمونه دارای کیفیت تحرک ضعیف مشخص گردید (جدول شماره ۵). در اسپرم تازه ماهی شیب بیشترین درصد تحرک انبوه سلولهای در  $2/20$  دقیقه اولیه پس از فعال شدن است و بتدریج درصد تحرک اسپرم بطور تصاعدی کاهش می‌یابد بطوریکه پس از گذشت  $4/50$  دقیقه بیش از ۹۰ درصد سلولهای جنسی فاقد هر گونه حرکتی است و باقیمانده سلولها دارای حرکت کند هستند. اسپرم های منجمد شده پس از ذوب شدن در آب گرم  $40^\circ\text{C}$  درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ تا ۲۵ ثانیه، حداکثر جمعیت متحرک رو به جلو در  $2/50$  دقیقه اولیه مشاهده شد و تحرک ۹۰ درصد اسپرم‌ها پس از حدود  $3/45$  دقیقه متوقف می‌گردد.

#### ۳-۳-۳-۲- تراکم اسپرم در تاسماهی شیب

میانگین تراکم اسپرم پنج نمونه جمع آوری شده در ماهی شیب با استفاده از لام هموسیتمتر و بررسی میکروسکوپی با بزرگنمایی  $(\times 400)$ ،  $2/45 \times 10^9$  اسپرماتوزوئید بوده است. حداقل تراکم اسپرم  $1/99 \times 10^9$  سلول و حداکثر تراکم  $2/84 \times 10^9$  عدد در هر سی سی محاسبه گردید (جدول ۵).

جدول شماره ۵- تراکم اسپرم درمولدین نر ماهی شیب در هر در هر میلی لیتر

شماره ماهی	تعداد اسپرم ( $\times 10^9$ )	کیفیت اسپرم	شماره ماهی	تعداد اسپرم ( $\times 10^9$ )	کیفیت اسپرم
۱	۲/۵۵	خوب	۴	۱/۹۹	ضعیف
۲	۲/۶۹	خوب	۵	۲/۸۴	متوسط
۳	۲/۲۰	متوسط			

### ۳-۳-۳- در صد تحرک اسپرم تازه و منجمد شده با محیط کشت (CM)

میانگین تحرک اسپرم تازه ۶۷ درصد و تحرک اسپرم در آزمایش انجماد و تست لقاح پس از انجمادزدایی، ۴۰ درصد بود است که بطور مشخص کمتر از نمونه شاهد (۷۵) بود.

### ۳-۳-۴- لقاح در اسپرم تازه و اسپرم منجمد شده در ازون برون با محیط کشت (CM)

میانگین درصد تحرک اسپرم تازه ( $n = 4$ )  $5/5 \pm 67/5$  درصد بود و میزان تحرک اسپرم منجمد پس از انجمادزدایی با استفاده از رقیق کننده (CM)  $6/1 \pm 40$  درصد محاسبه شد.

در آزمایش لقاح مصنوعی تخمک با اسپرم ماهی شیب، بر اساس جدول شماره ۶ میانگین لقاح در اسپرم تازه (شاهد)  $4/4 \pm 71/25$  درصد و میانگین درصد لقاح با اسپرم منجمد شده در پایوت  $26/5 \pm 7/9$ ، و در سرنگ انسولین  $24/75 \pm 7/3$  درصد ارزیابی شد.

درصد تحرک اسپرم منجمد شده بطور معناداری کمتر از درصد تحرک اسپرم تازه (شاهد) است.

درصد تحرک و لقاح اسپرم منجمد شده در ماهی شیب تاسماهی با محیط کشت (Biociphus)

مشاهدات میکروسکوپی حاکی از آن است که نمونه اسپرم ماهی شیب پس از رقیق شدن در محیط کشت Biociphus به نسبت ۱:۱ دارای درصد و کیفیت پایتتر از ۵ درصد است. بررسی ها نشان داد که اسپرم منجمد شده با این محیط کشت پس از انجمادزدایی فاقد هر گونه حرکتی است.

جدول شماره ۶- بررسی درصد تحرک و لقاح در اسپرم تازه و منجمد در محفظه سرنگ و پایوت

تراکم اسپرم (cc/۱۰ <sup>۹</sup> )	درصد لقاح با اسپرم انجمادزدایی شده (CM)		درصد تحرک اسپرم منجمد با محیط کشت (CM)	درصد لقاح با اسپرم انجمادزدایی شده		درصد تحرک اسپرم منجمد با محیط کشت (Biociphus)	درصد لقاح با اسپرم تازه	درصد تحرک اسپرم تازه
	پایوت	سرنگ		پایوت	سرنگ			
۲/۵۵	۱۶	۱۲	۴۰	۰	۰	۵	۶۶	۶۵
۲/۶۹	۲۸	۳۰	۴۵	//	//	۲	۷۲	۷۰
۲/۲۰	۲۴	۲۹	۳۰	//	//	۴	۶۹	۶۰
۲/۸۴	۳۸	۲۸	۴۵	//	//	۸	۷۸	۷۵

۳-۵- ارزیابی اسپرم تازه در فیل ماهی *Huso huso*

با بررسی اسپرم فیل ماهی، در زمینه تاریک میکروسکوپ نوری، مشاهده گردید که تقریباً تمامی سلولهای اسپرم در مایع سمینال غیرمتحرک بوده و پس از رقیق کردن با آب، درصد بالایی از اسپرم ها تحرک داشتند. در همین بررسی در مورد اسپرم منجمد، مشخص گردید که درصد تحرک اسپرم منجمد شده بعد از انجمادزادایی، پایین تر است.

## ۳-۵-۱- نتایج ارزیابی کیفی و مدت زمان تحرک اسپرم

در بررسی ۳ نمونه اسپرم استحصال شده از نظر کیفیت تحرک، ۱ نمونه دارای تحرک خوب و ۲ نمونه دارای تحرک متوسط مشخص گردید (جدول شماره ۷).

در اسپرم تازه فیل ماهی، بیشترین درصد تحرک انبوه سلولهای جنسی در ۳ دقیقه اولیه پس از فعال شدن است و بتدریج درصد تحرک اسپرم بطور تصاعدی کاهش می یابد بطوریکه پس از گذشت ۵ دقیقه بیش از ۹۰ درصد سلولهای جنسی فاقد هر گونه حرکتی است و باقیمانده سلولها دارای حرکت کند هستند.

در اسپرم های منجمد شده پس از ذوب شده در آب گرم ۴۰ درجه، حداکثر جمعیت متحرک رو به جلو در ۲ دقیقه اولیه مشاهده شد و تحرک ۹۰ درصد اسپرم ها پس از ۴ دقیقه متوقف گردید.

## ۲-۵-۳- تراکم اسپرم در فیل ماهی

میانگین تراکم اسپرم در سه نمونه جمع آوری شده در گونه فیل ماهی با استفاده از لام هموسیتمتر و بررسی میکروسکوپی با بزرگنمایی ( $\times 400$ )،  $10^9 \times 2/48$  اسپرم تخمین زده شد. حداقل تراکم اسپرم در این بررسی  $10^9 \times 2/02$  سلول و حداکثر تراکم  $10^9 \times 2/87$  عدد در هر سی سی محاسبه گردید.

## جدول ۷- تراکم اسپرم درمولدین نر فیل ماهی در هر سی سی

شماره ماهی	تعداد اسپرم ( $\times 10^9$ )	کیفیت اسپرم
۱	۲/۸۷	خوب
۲	۲/۰۲	متوسط
۳	۲/۵۶	متوسط

## ۳-۵-۳- درصد تحرک اسپرم تازه و منجمد شده با محیط کشت (CM)

میانگین تحرک اسپرم تازه در گونه فیل ماهی ۷۶ درصد تحرک اسپرم منجمد در آزمایش انجماد و تست لقاح پس از انجمادزدایی ۲۰ درصد برآورد گردید که بطور مشخص کمتر از نمونه شاهد (۷۰-۸۵) است.

## ۴-۵-۳- درصد لقاح در اسپرم تازه و اسپرم منجمد شده در فیل ماهی با محیط کشت (CM)

میانگین تحرک اسپرم تازه ( $n = 3$ )  $6/2 \pm 76/6$  درصد و میزان تحرک اسپرم انجمادزدایی شده  $4 \pm 20$  درصد محاسبه شد.

در آزمایش لقاح مصنوعی تخمک با اسپرم براساس جدول شماره ۸، میانگین لقاح در اسپرم تازه (شاهد)  $4 \pm 74$  درصد و میانگین لقاح با اسپرم منجمد شده در نمونه پایوت  $2/9 \pm 4$  درصد و در سرنگ انسولین  $3/5 \pm 0/5$  درصد ارزیابی شد. درصد تحرک اسپرم منجمد شده بطور معناداری کمتر از درصد تحرک اسپرم تازه (نمونه شاهد) است.

## ۵-۵-۳- درصد تحرک و لقاح اسپرم منجمد شده در فیل ماهی با محیط کشت (Biociphus)

پس از رقیق کردن اسپرم فیل ماهی با محیط کشت به نسبت ۱:۱ درصد تحرک اسپرم رقیق شده با رقت ۱:۵۰ و با بزرگنمایی  $\times 400$  مورد بررسی قرار گرفت. براساس مشاهدات، سلولهای اسپرم بدون حرکت یا دارای تحرک

خفیف و زنبی بودند. سپس در محفظه‌های پایوت و سرنگ انسولین پر شده و با دستگاه انجماد به روش سه مرحله‌ای منجمد گردید. پس از انجمادزدایی مطابق روش کار با میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی  $\times 400$  مورد بررسی قرار گرفت. براساس مشاهدات، سلولهای جنسی نر بدون حرکت بودند.

جدول شماره ۸- بررسی درصد تحرک و لقاح در اسپرم تازه و منجمد در محفظه سرنگ و پایوت

تراکم اسپرم (cc/۱۰ <sup>۹</sup> )	درصد لقاح با اسپرم انجمادزدایی شده (CM)		درصد تحرک اسپرم منجمد با محیط کشت (CM)	درصد لقاح با اسپرم انجمادزدایی شده		درصد تحرک اسپرم منجمد با محیط کشت (Biociphus)	درصد لقاح با اسپرم تازه	درصد تحرک اسپرم تازه
	پایوت	سرنگ		پایوت	سرنگ			
۲/۰۲	۷	۳	۲۰	۰	۰	۲	۷۴	۷۵
۲/۸۷	۵	۴	۲۵	//	//	۴	۷۹	۷۰
۲/۵۶	۰	—	۱۵	//	//	۲	۶۹	۸۵

#### ۴- بحث

با توجه به روند کاهشی صید مولدین ماهیان خاویاری و دسترسی محدود به مواد تناسلی، اهمیت ذخیره سازی و نگهداری آن در حجم بالا قابل توجه بوده تا بدین طریق از انقراض نسل آنها جلوگیری شود. با توجه به پیشرفت‌های شگرفی که در علم کرایوبیولوژی صورت گرفته، بشر توانسته از روش‌های متنوع آن در نگهداری سلولهای جنسی و جنین بهره ببرد. در این تکنیک سعی بر آن است تا با کاهش میزان تشکیل کریستال یخ داخل و خارج سلولی در مراحل انجماد و ذوب، قدرت حیاتی سلول را افزایش دهند. دو فاکتور اساسی در این امر دخالت دارد یکی استفاده از ماده محافظ سرمایی که سبب خروج سریع آب داخل سلولی می‌شود و دیگری سرعت انجماد که برای هر سلول متفاوت است و بستگی به نفوذپذیری غشاء سلول، نسبت سطح به حجم و درجه حرارت مایع اسپرم دارد. لازم است سرعت انجماد به گونه‌ای تنظیم شود که فرصت کافی برای خروج آب از سلول وجود داشته باشد.

اسپرم تاسماهیان، در واقع در پلاسمای منی بی حرکت است (Cosson and Linhart, 1996) و زمانی فعال می‌گردد که به محیط رقیق مانند آب یا محلول‌های کم شور منتقل می‌شود و بلافاصله حرکات سریع رو به جلو دارند (Drabkina, 1991) که از نظر رفتاری، شبیه اسپرم گونه‌های ماهیان استخوانی است. تمام پارامترهای تحرک از قبیل فرکانس زنبش، سرعت و دامنه حرکت به صورت گسیخته طی دوره تحرک کاهش می‌یابد.

طی مراحل اولیه تحرک، اسپرم‌ها با سرعت زیادی حرکت می‌کنند. بتدریج حرکت مستقیم اسپرم در زمان ۳-۶ دقیقه بعد از فعال سازی کاهش می‌یابد. گاهی بعضی از سلولهای اسپرم تا ۹ دقیقه حرکت دارند این توالی رفتار، در مورد اسپرم چندین گونه مشاهده شده است. (Cosson, 2000)

از جمله در ماهی قزل‌آلا (Cosson, 1989-1991)، گربه ماهی اروپا (Billard et al., 1997)، ماهی کپور (Perchec et al., 1993)، عقرب ماهی (Lahnsteiner et al., 1997)، ماهی سوف رودخانه‌ای (Lahnsteiner et al., 1997)، در چندین گونه تاسماهی (Cosson et al 1995; Tsvetkova et al., 1996)، در پاروپوزه (Cosson et al., 1995; Linhart et al., 1996)، در گرگ ماهی (Fauvel et al., 1998; Dreanno et al., 1999)، در ماهی هالیوت (Billard et al., 1993)، و در ماهی تربوت (Chauvaud et al., 1995).

در تاسماهی و شبه تاسماهی، اطلاعات اندکی در زمینه مدت زمان تحرک اسپرم در دست است و اطلاعات گزارش شده در مورد مدت زمان تحرک و ویژگیهای تحرک اسپرم در گونه‌های مختلف بسیار متغیر است.

برای مثال Ginsburg (1968) زمان تحرک اسپرم در فیل ماهی (*Huso huso*) را ۱۳ دقیقه گزارش نمود و Linhart *et al.*, (1995)، Mims (1991) مدت زمان تحرک اسپرم در گونه *Polyodon spatula* را ۴-۶ دقیقه اعلام کردند. درحالی که Toth *et al.*, (1997) اعلام کرد که اسپرم تاسماهی دریاجه ای *Acipenser fulvescens* در ۱۲ درجه سانتیگراد، به مدت ۳۰ دقیقه تحرک دارد.

Gallis و همکارانش در سال ۱۹۹۱ نشان دادند که تحرک اسپرم، در تاسماهی سبیری *Acipenser baeri* بعد از رقیق کردن در آب مقطر یا محلول نمک طعام شروع شده و بطور منظم کاهش یافته و پس از حدود ۵ دقیقه متوقف می‌گردد.

بر اساس بررسی بعمل آمده در این طرح، مشخص گردید نمونه اسپرم‌های استحصال شده در چهار گونه از ماهیان خاویاری شامل تاسماهی ایرانی (*A. persicus*)، ازون برون (*A. stellatus*)، شیپ (*A. nudiventris*) و فیل ماهی (*H. huso*) با مشاهده در زمینه تاریک میکروسکوپ در پلاسمای منی بی حرکت است و تنها بعد از رهاسازی در محیط خارجی فعال می‌شوند و دوره تحرک آنها کوتاه است. این وضعیت در مورد بسیاری از سایر گونه‌های تاسماهیان نیز گزارش شده است (Linhart, 1995).

نتایج حاصل از بررسی‌های کمی و کیفی نشان دادند که تحرک اسپرم تازه در گونه‌های مختلف تاسماهیان حوضه جنوبی دریای خزر حدود ۵-۷ دقیقه است و در مقایسه با مدت زمان تحرک اسپرم منجمد، بطور مشخص بیشتر است. بعبارت دیگر، مدت زمان تحرک اسپرم بعد از انجماد زدایی کمتر از مدت زمان تحرک اسپرم تازه است.

در شرایط عادی طول عمر گامت‌های تاسماهیان بسیار کوتاه است و حداکثر باروی اسپرم در دمای معمولی ۶-۵ ساعت بعد از استحصال آن از مولد است. ولی زندگی اسپرماتوروئیدها در حرارت‌های پایین زیاده‌تر می‌گردد. در فرآیند نگهداری اسپرم در دماهای پایین (۱۹۶- درجه سانتی‌گراد) وضعیت بسیار متفاوت است و بایستی شرایطی ایجاد شود تا سلولهای اسپرم قادر باشند شرایط سخت انجماد را تحمل کنند. در این برودت آب به

شکل کریستال در آمده و هیچ واکنش وابسته به حرارت در این سیستم آبی انجام پذیر نیست و گامت‌های جنسی می‌توانند قدرت حیاتی خود را تا مدت طولانی حفظ کنند.

در واقع، برای اینکه گامت جنسی نر بتواند در حالت انجماد زنده بماند، بایستی مقداری از آب خود را از دست بدهد. این عمل با افزودن مواد محافظ سرمایی انجام می‌پذیرد. مهمترین نقش ماده محافظ سرمایی در انجماد، جلوگیری از تشکیل کریستال یخ داخل سلولی است که به دو دسته تقسیم می‌شوند:

دسته اول، ماده محافظ نفوذپذیر داخل سلولی شامل گلیسرول، دی متیل سولفوکساید، اتیلن گلیکول و پروپاندیول بوده و اغلب دارای خواص سمی برای سلولها می‌باشد اما در کار بسیاری از محققینی که در مورد انجماد اسپرم ماهیان فعالیت نموده‌اند، مورد استفاده قرار گرفته است.

دسته دوم، ماده محافظ نفوذناپذیر خارج سلولی شامل ساکارز، دی ساکارید ها، لیپوپروتئین ها و زرده تخم مرغ بوده که اغلب غیرسمی بوده و به علت بزرگی در خارج سلول باقی می‌مانند.

این ترکیبات به شکل های مختلف موجب محافظت سلول در مراحل انجماد می‌شوند. ترکیبات مذکور وارد سلول نمی‌شوند اما به خروج آب از سلول پیش از انجماد کمک می‌کنند. همچنین پس از انجماد در زمان آب‌دهی با رقیق کردن محیط، مانع از تورم بیش از حد سلول می‌شوند.

ساکاریدهای موجود در محیط کشت قدرت نگهداری بخش قابل ملاحظه‌ای از آب را دارند و می‌توانند سبب ویتریفیکاسیون (شیشه ای شدن) اب خارج سلولی شوند.

در فرآیند انجماد زمانی که اسپرم رقیق شده در معرض برودت ازت مایع قرار می‌گیرد، ابتدا با تشکیل بلورهای یخ در اطراف سلول، بخشی از آبهای داخلی سلول اسپرماتوزوئید بر اثر فشار اسمزی به بیرون رانده می‌شود، در نتیجه انجماد سریع موجب کاهش مقدار از دست دادن آب داخلی سلولی شده و موجب تشکیل سریع بلورهای کوچک‌تر یخ در داخل سلول می‌شود. در این حالت کمترین آسیب به سلول وارد می‌گردد.

در صورتی که سلول اسپرماتوزوئید بطور خیلی سریع در ازت مایع منجمد شود، زنده نخواهد ماند زیرا محیط داخل سلول وقت کافی برای ازدست دادن آب نخواهد داشت، این در حالی است که ازدست دادن آب فقط تا حدی لازم است که اسپرم بتواند در مراحل سرد شدن و انجماد زنده بماند.

در مرحله انجمادزدایی و ذوب وقوع دو حادثه ممکن است باعث تخریب و انهدام سلولهای اسپرم شود:



## (۱) تشکیل مجدد کریستال یخ داخل سلول

## (۲) شوک اسمزی

تشکیل مجدد کریستال یخ، بستگی به سرعت انجماد و ذوب دارد. در زمانی که سرعت انجماد سریع باشد چون آبگیری بطور کامل صورت نمی گیرد، مقداری آب درون سلول باقی می ماند. اگر ذوب نیز به آرامی انجام شود این فرصت به سلول داده می شود که آب باقیمانده هنگام عبور سلول از نقطه انجماد به کریستال تبدیل شود. اگر سرعت ذوب زیاد باشد، از شکل گیری کریستال یخ جلوگیری خواهد کرد.

کیفیت اسپرم های انجماد یافته به فاکتورهای مختلفی بستگی دارد. میزان این ارتباط با توجه به فاکتورهای فیزیولوژیک مانند درجه تکامل گناد و کیفیت اولیه اسپرم همچنین فاکتورهای خارجی مانند عوامل محافظی (Cryoprotect) و شدت های سرمادهی متفاوت است.

در این تحقیق فرض براین است که شرایط استرس ناشی از صید و انتقال تاسماهی، همچنین زمان استحصال اسپرم تأثیر معکوسی در کیفیت اسپرم نداشته است.

نکته مهم در فرآیند انجماد اسپرم، انجام مراحل سرمادهی در حداقل زمان ممکن است (Stoss, 1983) و حجم محفظه های نگهداری و ذخیره اسپرم، نایستی زیاد باشد تا نفوذ سرما قادر باشد بطور یکنواخت کل نمونه ها را منجمد نماید.

نتایج حاصل از آنالیز واریانس یکطرفه (one way Anova) در ارتباط با مقایسه درصد تحرک اسپرم منجمد شده در چهار گونه مورد بررسی حاکی از وجود ارتباط معنی دار آماری است و در همین رابطه براساس آزمون توکی (Tukey) بین درصد تحرک اسپرم منجمد شده فیل ماهی (۲۰ درصد) با ماهی شپ (۴۰ درصد)، ازون برون (۳۷/۵) و قره برون (۳۲ درصد) اختلاف معنی دار آماری مشاهده می شود. ( $p < 0.001$  و  $p < 0.003$   $p < 0.02$ ) و از این لحاظ گونه شپ، ازون برون و قره برون از وضعیت بهتری نسبت به فیل ماهی برخوردار است.

براساس آزمون آنالیز واریانس یکطرفه بین درصد لقاح با اسپرم تازه و درصد لقاح با اسپرم انجمادزدایی شده بوسیله سرنگ انسولین و پایوت در کلیه گونه های مورد بررسی ارتباط معنی دار آماری مشاهده می شود.

( $P < 0.05$ )

در آزمون توکی (Tukey) نیز بین درصد لقاح با اسپرم تازه (۷۷/۸۱ درصد) به ترتیب با درصد لقاح با اسپرم انجمادزدایی شده با سرنگ انسولین (۲۵/۸۸ درصد) و پایوت (۲۷/۰۶ درصد) اختلاف معنی دار آماری مشاهده می شود. ( $p = 0/00$  و  $p = 0/00$ )

برای مقایسه اثر دونوع محفظه ذخیره اسپرم بر این مطالعه با حجم های یک میلی لیتری و نیم میلی لیتری براساس آزمون توکی (Tukey) بین درصد لقاح در اسپرم انجمادزدایی شده بوسیله سرنگ انسولین (۲۵/۸۸ درصد) و پایوت (۲۷/۰۶ درصد) در کلیه گونه های مورد بررسی هیچ گونه اختلاف معنی دار آماری مشاهده نشد. ( $P > 0.05$ ) به نظر می رسد اسپرم ماهی مولد صید شده از رودخانه دارای کیفیت بهتر بوده زیرا ماهی زمانی به رودخانه می آید به رسیدگی جنسی رسیده است. براساس گزارش (Stoss, 1983)، اسپرم هایی که در زمان اوج تخمیزی تهیه می شود بهتر به استرس های ناشی از انجماد و کریستاله شدن جواب می دهند.

استفاده از مواد محافظ سرمایی از قبیل گلیسرول سبب بازماندگی تحرک اسپرم در تمام گونه های تاسماهیان می شود در صورتی که ماده محافظ سرمایی دی متیل سولفو کساید (DMSO) با غلظت ۱۵-۱۰ درصد مناسب ترین حفاظت سرمایی را دارد. تریس - HCL به میزان ۱۵۰-۱۰۰ میلی مول با  $pH = 8$  است.

براساس تجارب بدست آمده باید به این مسئله مهم توجه داشت که همواره نمونه اسپرمی برای انجماد انتخاب شود که دارای درصد و کیفیت تحرک زیادی باشند و همچنین از زمان استحصال آنها، مدت زمان زیادی نگذشته باشد زیرا طی فرآیند انجماد تعداد زیادی از گامت ها بر اثر استرس و فشار اسمزی ناشی از کریستاله شدن تلف می شوند و چنانچه از اسپرم های نامرغوب برای انجماد استفاده گردد، درصد تحرک سلولهای منجمد پس از انجمادزدایی فوق العاده کم است. (نویری و همکاران، ۱۳۸۲) با توجه به اینکه در اثر انجماد درصد و کیفیت اسپرم کاهش می یابد در نتیجه میزان اسپرم منجمد است نتایج آزمایش اولیه در این تحقیق نشان داد که استفاده از محیط کشت حاوی گلیسرول بعنوان ماده محافظ سرما (cryoprotect) موجب توقف تحرک سلولهای اسپرم در تمام گونه های تاسماهیان مورد آزمایش گردیده است و به هیچ وجه برای تهیه محیط کشت بعنوان ماده محافظ سرما توصیه نمی شود. این نتایج با یافته های حاصل از مطالعات Kopeika و همکارانش (۲۰۰۰) مطابقت دارد که آزمون های مشابهی درخصوص بررسی محیط کشت حاوی گلیسرول بعنوان ماده محافظ سرمایی در انجماد اسپرم تاسماهیان به انجام رسانده اند..

انجماد اسپرم ماهیان با مشکلات مختلفی مواجه است که از جمله حساسیت بالا نسبت به فاکتورهای فیزیکی (اسمزی) و فاکتورهای شیمیایی که بواسطه انجماد رخ می دهد، بخصوص اسپرم گونه های تاسماهیان نسبت به انجماد بسیار حساس است. این امر احتمالاً بدلیل وجود آکروزوم ها است که در گامت های جنسی نر اغلب ماهیان استخوانی وجود ندارد

کیفیت اولیه اسپرم احتمالاً در موفقیت انجماد نقش اساسی دارد که این کیفیت به عوامل مختلفی بستگی دارد از جمله شرایط زیست محیطی ماهیان نر از قبیل دما و کیفیت غذا طی مرحله گامتوژنز که بر ترکیب و ساختار غشاء اسپرم موثر خواهد بود.

در این پژوهش نمونه اسپرم های منتخب شده برای انجماد بایستی دارای ویژگیهای ذیل باشد:

(۱) برای اولین بار از مولد نر استحصال شده باشد.

(۲) درصد تحرک اسپرم از نظر تعداد سلول های زنده دارای حرکت بالای ۶۰ درصد باشد.

(۳) کیفیت تحرک اسپرم از نظر سرعت سلول و نحوه حرکت مناسب باشد.

بر اساس مشاهدات بعمل آمده اسپرم های تازه استحصال شده با خصوصیات بالا پس از رقیق شدن در آب یا محلول فعال کننده در سه دقیقه اول دارای بیشترین درصد تحرک است. پس از سپری شدن این مدت، سرعت درصد و کیفیت تحرک سلولها کاهش می یابد. چنین امری در مورد اسپرم های انجماد زدایی شده نیز صادق است

در مجموع مدت زمان تحرک گامت حنسی نر انجماد زدایی شده نسبت به گامت های تازه استحصال شده بطور قابل مشهودی کمتر است و فرآیند انجماد منجر به کاهش قابل توجهی در درصد تحرک اسپرم در هر چهار گونه مورد بررسی می گردد. همچنین قابلیت باروری اسپرم ها بعد از انجماد کاهش می یابد.

## پیشنهاها

- ۱- با توجه به نتایج حاصل از این طرح، پیشنهاد می گردد برای لقاح تخمک با استفاده از اسپرم منجمد شده بلافاصله پس از انجماد زدایی عملیات لقاح مصنوعی انجام گیرد و چنانچه در نظر است با وقفه ای صورت پذیرد، اسپرم های ذوب شده در لایه ای نازک و در دمای ۵+ درجه نگهداری گردد.
- ۲- با توجه به وجود شرایط سخت در برودت زیاد بر سلول ها، پیشنهاد می گردد همواره از اسپرم هایی با درصد و کیفیت تحرک بالا برای فرآیند انجماد و ذخیره طولانی مدت استفاده شود.
- ۳- پیشنهاد می شود در صورت امکان از اسپرم مولدین صید شده در رودخانه همچنین از اسپرم های استحصال شده از مولدین در زمان اوج تخمیزی برای فرآیند انجماد استفاده گردد.
- ۴- با توجه به کمبود اطلاعات پایه در زمینه انجماد اسپرم ماهیان خاویاری بخصوص تاسماهیان دریای خزر، پیشنهاد می گردد برای تبادل نظر، کارگاه آموزشی با حضور متخصصین حاذق کشور اکراین و روسیه برگزار گردد.

## تشکر و قدردانی

بدینوسیله مراتب تشکر و قدردانی خود را از کلیه سرورانی که بنحوی در اجرای مراحل مختلف پروژه همکاری صمیمانه‌ای داشته اند اعلام داشته و از خداوند متعال موفقیت روزافزون آنان را خواستارم.

از جناب آقای دکتر سهراب رضوانی ریاست محترم مؤسسه تحقیقات شیلات ایران و جناب آقای دکتر متین‌فر ریاست محترم بخش آبی‌پروری مؤسسه که شرایط اجرای پروژه را مهیا نمودند، قدردانی می‌گردد

- مشاور محترم پروژه جناب آقای دکتر محمد پورکاظمی ریاست محترم انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری

- جناب آقای دکتر محمود بهمنی معاونت محترم تحقیقاتی انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری

- همکاران محترم پروژه جناب آقایان: مهندس شهروز برادران نویری، مهندس محمدرضا نوروز فشخامی

- همراهی و مساعدت بیدریغ آقایان: مهندس حامد یوسف‌پور، مهندس محمد پوردهقانی، مهندس جلیل

جلیل‌پور

همچنین از همکاری صمیمانه جناب مهندس آخوندزاده ریاست محترم مجتمع تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری

شهید بهشتی، جناب آقای مهندس صمد درویشی معاونت محترم و مهندس حسین محمدی پرشکوهی مسئول

محترم بخش تکثیر و پرورش مجتمع شهید بهشتی رشت، جناب آقای مهندس علی طاهری مسئول محترم بخش

تکثیر و پرورش مرکز تکثیر و پرورش شهید مرجانی گرگان

و از کلیه پرسنل بخشهای ستادی (ترابری، خدمات، اداری و مالی، انتظامات) که هر کدام سهمی را در اجرای این

پروژه داشتند.

## منابع

- آذری تاکامی، ق. و کهنه شهری، م.، (۱۳۵۳). تکثیر و پرورش مصنوعی ماهیان خاویاری. انتشارات دانشگاه تهران. ۲۶۷ صفحه.
- آهنگری، یوسف و آکسفورد، راجرز و آپ دوی، یوآن (۱۳۷۳). انجماد اسپرم قوچ در محلول هیپرتونیک حاوی رافینوز. پژوهش و سازندگی، شماره ۲۵، زمستان ۷۳، صفحه ۹۷-۹۱.
- اسلامبولچی، شبنم (۱۳۷۸). تخمین تراکم اسپرم ماهی کپور، آمور و ازون برون با استفاده از روش اسپکتروفتومتری. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشکده شیلات دانشگاه منابع طبیعی گرگان
- ایزدی، علی (۱۳۷۱). بررسی اسپرم تاسماهیان و طرز نگهداری اسپرم در ماهیان مختلف. پروژه دانشجویی از دانشکده منابع طبیعی کرج. ۹۳ صفحه
- برادران نویری، شهروز، علیرضا علیپور، محمدپور کاظمی (۱۳۸۲). انجماد اسپرم پنج گونه از تاسماهیان دریای خزر. مجله علمی شیلات ایران، ویژه نامه اولین سمپوزیوم ملی ماهیان خاویاری پاییز ۱۳۸۲. صفحه ۲۸-۲۳.
- برادران نویری، شهروز (۱۳۷۷). انجماد اسپرم ماهی کپور. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی دانشگاه شهید چمران. اهواز. ۱۰۴ صفحه.
- شعبانی، اسحاق (۱۳۷۷). بررسی کیفیت اسپرم تاسماهیان (گونه ازون برون). پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان. ۱۴۳ صفحه.
- شکیبی، علی (۱۳۷۹). بررسی امکان انجماد و نگهداری اسپرم ماهی قزل آلا رنگین کمان. پایان نامه کارشناسی ارشد دانشگاه تربیت مدرس دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی نور. ۸۵ صفحه.
- صالح نیا، مژده، منصوره موحدین، مجتبی رضازاده (۱۳۸۰). تکنیک های تجربی جنین شناسی. انتشارات پایگان. چاپ اول، ۱۰۵ صفحه
- عابدی، م.، (۱۳۷۵). بررسی امکان انجماد اسپرم در ماهیان خاویاری. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان. ۹۵ صفحه.
- قاسمی، جواد (۱۳۷۷). تعیین روش انجماد و نگهداری اسپرم ماهی سفید دریای خزر. پایان نامه کارشناسی ارشد دانشگاه گرگان، دانشکده شیلات و محیط زیست. ۱۹۴ صفحه
- میرزایی، ابراهیم (۱۳۶۸). شناخت بهترین رقیق کننده برای انجماد اسپرم ماهیان خاویاری. گزارش مرکز تحقیقات شیلات گیلان. ۱۷ صفحه
- هاشمی، مسعود (۱۳۷۵). تلقیح مصنوعی در گاؤ (فیزیولوژی تولید مثل و تلقیح مصنوعی) انتشارات فرهنگ جامع. چاپ دوم، ۳۰۲ صفحه
- هاشمی، مسعود (۱۳۷۰). تلقیح مصنوعی کاربرد روشهای آزمایشگاهی و عملی در تولید مثل دام. انتشارات فرهنگ جامع. ۲۰۷ صفحه
- Billard, R.; Cosson, J.; Perche, G. and Linhart, O., 1995. Biology of sperm and artificial reproduction in carp.

Aquaculture, Vol.124, pp.95-112.

-Billard, R.; Tsvetkova, L.I.; Cosson J. and Linhart O., 1997. Motility analysis of fresh and thawed spermatozoa in *Acipenser baeri*. 3rd Inter. Sym. Sturgeon. Piacenza, Italy. July 8-11 1997. Abstract book, AIO.

-Cherepanov, V.V.; Drokin, S.I.; Ochkur, S.I.; Dzuba B.B.; Chikhachoc, A.S. and Kopeika E.F., 1993. Freezing of sperm of the Azov-Black sea Acipenserids: In Sympo. on sturgeons. Sep 6-11 1993. Moscow, Russia, pp.63-64.

-Cherepanov, V.V. and Kopeika, E.F., 1997. Cryopreservation and low temperature of sturgeon sperma. J. Appl. Ichthyol. Vol.15. pp.311.

-Cosson, J. and Linhart, O., 1996. Paddlefish (*Polyodon spathula*) spermatozoa: Effects potassium and pH on motility. Folia Zoologica 45(4), 361-370

-Cosson, J.; Linhart, O.; Mims, S.D.; Shelton, W.L. and Rodina, M. 2000. Analysis of motility parameters from paddlefish and shovelnose sturgeon spermatozoa. Journal of Fish Biology 56, 1348-1367

-Detlaff, T.A. A.S. Ginsburg and O.I. Schmalhausen. 1993. Sturgeon fishes: Developmental biology and aquaculture. Springer-verlag. Berlin. pp.300

-Drokin S.I.; Cherepanov, V.V.; Kopeika, E.F.; Shilin, N.I., 1991: Sturgeon Sakhalin: gene pool conservation. Rybnoje Chozjajstvo. Russian (7), 38-39

-Drokin S.I. and Kopeika, E. F., 1997. Cryopreservation and phospholipid content of spermatozoa of some sturgeon species. J. Appl. Ichthyol. Vol.15, pp.311.

-Dzuba, B.B.; Kopeika, E.F.; Cherepanov, V.V. and Drokin S.I., 1997. Sturgeon sperm quality after 6 years of cryopreservation. 3rd Inter. Sym. Sturgeon. Piacenza, Italy. July 8-11 1997. Abstract book, AIO.

-Gallis, J.L.; Federico, E.; Jatteau, P.; Bonpunt, E. and Billard, R. 1991. Siberian sturgeon *Acipenser baeri*, spermatozoa: Effect of dilution, pH, osmotic pressure, sodium and potassium ions on motility. Cemagref Publ., 143-151

-Koldras, M. and Mejza, T., 1983. Effects of quantity and quality of carp sperm on egg fertilization success. Acta Ichthyologica et piscatoria, Vol.13, No2, pp.83-92

\_ Kopeika, E.F.; Williot, P. and Goncharov, B.F., 2000. Cryopreservation of Atlantic sturgeon *Acipenser sturio* L., 1758 sperm: First results and associated problems. Bol. Inst. Esp. Oceanogr. 16(1-4). 2000: 167-173

\_ Lahnsteiner, F.; Weismann, T.; Patzner, R.A. Methanol as cryoprotectant and the suitability of 1.2 ml and 5 ml straws for Cryopreservation of semen from salmonid fishes. Aquaculture Research, (1997) 28, 471-479.

-Linhart, O.; Mims, A.D. and Shelton, W.L., 1995. Motility of spermatozoa from shovelnose sturgeon (*Scaphirhynchus platyrhynchus* Rafinesque 1820) and paddlefish (*Polyodon spathula* Walbaum, 1797). J. Fish Biol. Vol.97, pp.902-909.

-Linhart, O., Billard, R., and Protchau, J. 1993. Cryopreservation of European cat fish (*Silurus glanis* L.) spermatozoa. Aquaculture, 115:347-359

Moczarski, M. (1997). Deep freezing of carp *Cyprinus carpio* L. sperm Bulletin Sciences Biology 25:187-190

Morisawa, M., Suzuki, K., Shimizu, H., Morisawa, S. and Yasuda, K (1983). Effects of osmolality and potassium on motility of spermatozoa from freshwater cyprinid fishes. J. Exp. Biol 107, 95-103

Scott, A.P., and J.H. Baynes. 1980. A view of the biology and handling and storage of salmonid spermatozoa. Journal of fisheries Biology 17: 707-739

-Stoss, J., 1983. Fish gamete preservation and spermatozoa physiology. In: Fish physiology. Vol 1. IX. Reproduction (eds. Hoar, W. S.; Randell, P. J. and Donaldson, E. M). Academic Press. pp.305-341.

Toth, G.P.; Ciereszko, A. Christ, S.A. and dabrowski, K. 1997. Objective analysis of sperm motility in the lake sturgeon, *Acipenser fluviensis*. Activation and inhibition conditions. Aquaculture 154 (3-4), 337-348

Terner, C., 1986. Evaluation of Salmonid Sperm Motility for Cryopreservation: Fish-Culturist: Vol. 48, No. 3, pp. 230-232

-Tsvetkova, L.I.; Cosson, J.; Linhart, O. and Billard, R., 1996. Motility and fertilizing capacity of fresh and frozen-thawed spermatozoa. In: sturgeons *Acipenser baeri* and *Acipenser ruthenus*. J. Appl. Ichthyol. Vol.12, pp.107-112.

-Weeler, P.A. and Thorgaard, G.H., 1991. Cryopreservation of rainbow trout semen in large straws. Aquaculture, Vol.93, pp.95-100.

Williot, P., E.G. Rochard, T. Castelnaud, R. Rouault, M. Brun, M. Lepage and P. Elie 1997. Biological characteristics of European Atlantic sturgeon *Acipenser sturio* as the basis for a restoration program in France. Environmental biology of fishes 48: 359-370.

Williot, P. Kopeika, E.F. and Goncharov, B.F., 2000. Influence of testis state, temperature and delay in semen collection on spermatozoa motility in the cultured Siberian sturgeon (*Acipenser baeri* Bradt). Aquaculture 189 (2000) 53-61.

## Abstract

Considering decrease in total catch of sturgeon & threat of extinction in their stocks, special measures might be adopted.

Sperm cryopreservation is one of the suitable methods to prepare bank of frozen gamete for future use in artificial breeding in order to prohibit extinction of sturgeon stocks.

This study carried out on 27 male sturgeon during 2001-2004. The investigated sturgeon include 12 male Persian sturgeon (*Acipenser persicus*), 7 male *Acipenser stellatus*, 5 male *Acipenser nudiventris* and 3 male *Huso huso*. Sperm Collected from spawners in shahid Beheshti & Shahid Marjani sturgeon rearing & propagation Complex in Rasht & Gorgan. The Sperm which was collected from shahid Marjani propagation complex placed in the sealed Vessels & transferred by coleman in near zero temperature to cryopreservation laboratory of international sturgeon research institute for further investigation.

In this study, the sperm was diluted in ratio 1:1 in two culture media containing dimethylsulfoxide & glycerol (BC) and the samples stored in 1 ml insulin syringe & 0.5 ml plot. The diluted sperm froze in an special temperature by automated freezer model 5300 (France IMV). Three phases applied to freeze the samples which are as follow:

- 1- Begin to freeze from  $+5^{\circ}\text{C}$  to  $-10^{\circ}\text{C}$  ( $3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ )
- 2- From  $-10^{\circ}\text{C}$  to  $-70^{\circ}\text{C}$  ( $20^{\circ}\text{C}/\text{min}$ )
- 3- From  $-70^{\circ}\text{C}$  to  $-130^{\circ}\text{C}$  ( $25^{\circ}\text{C}/\text{min}$ )

After freezing, the samples placed in liquid nitrogen containers with  $-196^{\circ}\text{C}$  temperature.

For thawing, the sperm samples took out of liquid nitrogen & placed in water  $40^{\circ}\text{C}$ . Then motility percent & the sperm quality investigated under 400x microscope.

According to the results the mean motility percentage of fresh sperm in Persian sturgeon, *Acipenser Stellatus*, *Acipenser nudiventris* and *Huso huso* was 84, 73.75, 67.5 and 76.66, respectively. The mean percentage of motility in frozen sperm which placed in media containing dimethylsulfoxide was 32, 37.5, 40 and 20%, respectively. Also, the frozen samples that preserved in BC media (Biociphus) showed 5.2, 75.25, 4.11 and 2.66% motility, respectively. In blank group, the mean fertilization percent of eggs was 90, 72, 71.25 and 90%, respectively. In the treatment group applying frozen sperm in culture media containing dimethylsulfoxide, the mean fertilization rate was 30, 6.5, 25.39 and 4.75%. Furthermore, no fertilization (0.0%) observed using frozen sperm stored in Biociphus culture media containing glycerol. There was no significant difference in fertilization percent comparing the two storage places (syringe & Plot).

According to investigations the culture media containing dimethylsulfoxide, is a suitable diluter for sturgeon sperm. So, the Cryopreservation technique can be used to preserve the sturgeon sperm for future fertilization & through this way we can prevent extinction of sturgeon stocks.

**Keyword:** Sturgeon, *Acipenser persicus*, Spermatozoa, freezing



This document was created with Win2PDF available at <http://www.daneprairie.com>.  
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.